

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización molecular de la alfa-talasemia no deleción y  
hemoglobinopatías estructurales de cadena alfa en España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Félix de la Fuente Gonzalo**

Directoras

**Ana Villegas Martínez  
Paloma Roperó Gradilla**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ALFA-TALASEMIA NO  
DELECIÓN Y HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES DE CADENA  
ALFA EN ESPAÑA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Félix De La Fuente Gonzalo**

**Directoras**

**Ana Villegas Martínez**

**Paloma Roperó Gradilla**

**Madrid, 2015**



La Dra. Ana Villegas Martínez, catedrática del Departamento de Medicina, profesora emérita de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y académica de número de la Real Academia Nacional de Medicina

y la Dra. Paloma Ropero Gradilla, investigadora de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico San Carlos y colaboradora en docencia práctica del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Caracterización molecular de la alfa-talasemia no delección y hemoglobinopatías estructurales de cadena alfa en España”** ha sido realizado bajo su dirección en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid por D. Félix De La Fuente Gonzalo, licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, para optar al GRADO DE DOCTOR por la misma universidad.

Madrid, 24 de septiembre de 2015

Ana Villegas Martínez

Paloma Ropero Gradilla





*El fracaso es una gran oportunidad para empezar otra vez con más inteligencia.*

**Henry Ford (1863-1947)**

*Cuando la vida te presente razones para llorar, demuéstrale que tienes mil y una razones para reír.*



**A mi madre y a mi hermano  
por su apoyo incondicional.**





## **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directoras la Dra. Villegas y la Dra. Roperio. Mi más sincero agradecimiento por todo el tiempo que me habeis dedicado y por los sabios consejos que me habeis aportado durante estos 6 años en los cuales habeis contribuido a mi formación como investigador.

Me gustaría agradecer a la Dra Villegas que me diese la oportunidad de iniciar mi trayectoria laboral en su servicio y que confiase en mí desde el principio cuando acababa de terminar mi licenciatura. Al Dr. Díaz Mediavilla, por haberme permitido seguir formándome en su servicio y al Dr. Martínez por darme la oportunidad de terminar mi tesis.

Sin tu ayuda, Paloma, todo este trabajo no sería posible, mil gracias por confiar siempre en mí, por aportarme otra visión más positiva en los momentos difíciles y por haberme enseñado tantas cosas de los “entresijos” de las talasemias. No puedo olvidarme tampoco del Dr. González, Ata para los amigos, por ser una persona tremendamente sabia pero a la vez una de las personas más modestas que conozco. Gracias por haberme enseñado una pequeña parte de todo lo que sabes.

Mi estancia en el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin Carmina, has sido como una segunda madre en muchos momentos, siempre preocupada por todos, procurando que todos estemos bien. Cada mañana tenías una sonrisa para todos por muy duro que fuese el día. Hace muy poco que ya no te vemos a diario y se te echa de menos enormemente.

A mis compañeros Jorge y Lara, “becarios precarios”, que me han acompañado en los sabores y sin sabores de la tesis a lo largo de estos años, especialmente quiero agradecerte, Jorge, tu inestimable ayuda con la portada y con el SPSS, así como esos buenos ratos compartidos en congresos, sesiones clínicas, cursos y cenas.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a María, la “secre”, porque haces que lo difícil parezca fácil y sin duda todo lo relacionado con burocracia llevaría mucho más tiempo sin tu ayuda. Agradecerte tus animos durante todos estos años y la felicidad que me has demostrado con cada pequeña cosa que hacía por tí, desde luego mucho menos de lo que tú siempre has hecho por mí.

A Isabel y Mari Carmen agradeceros vuestra ayuda con el modulab nuevo y el viejo para poder recopilar toda la información que he necesitado para hacer mi tesis. También quería agradecer a Manuel Enrique Fuentes por su intensa revisión de la estadística de mi tesis.

Gran parte de mi trabajo ha implicado mi estrecha relación con el secuenciador y en consecuencia, con Miguel Fernández Arquero, agradecerte tus explicaciones de porqué cada 2 por 3 el equipo se ponía a hacer de las suyas, lo que ralentizaba enormemente el trabajo pero tú siempre tenías un plan B para solucionarlo. Gracias a Bea porque siempre estuviste pendiente de reclamar todos los reactivos que hiciera falta y porque estás consiguiendo la meta que te habías propuesto y me alegro un montón de volverte a ver en el hospital.

Gracias a las enfermeras Charo, Esperanza, Toya, Toñi y Menchu por haber estado siempre dispuestas a pinchar a todos los pacientes y controles que he necesitado. A las auxiliares Maria Luisa, Isabel y Teresa por vuestro trabajo duro. A los y las coagulantes Toya, Eduardo y Chon por haber compartido tantas y tantas veces a “la niña”, alias Triturus y por invitarme a redesayunar cosas ricas cada vez que voy a vuestro laboratorio. No puedo dejar de destacar a las nuevas incorporaciones Estefanía, María, María y Carmen que son la alegría de la huerta y que habeis supuesto un soplo de aire fresco para el servicio.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Torrejón y a la Dra. Fenoyar sus aportaciones en el campo de las hemoglobinas glicosiladas y del diagnóstico prenatal respectivamente, que me han ayudado a entender mejor algunas nociones y conceptos. Gracias a la Dra. Núñez por darme animos siempre que me veía un poco negativo.

Quiero agradecerte Gloria tu confianza en mí desde el minuto cero y también la alegría que nos traes cada vez que vienes a vernos. A Miriam agradecerte tu amistad y tu apoyo en todos los bolos, en especial todos aquellos que tuviesen como destino algún lugar de La Mancha de cuyo nombre no quiero acordarme.

Mi estancia en el laboratorio de Eritropatología no puede entenderse sin la ingente cantidad de Médicos residentes que nos visitan todos los meses para completar su formación con nosotros procedentes de los Hospitales Ramón y Cajal, La Paz, La Princesa, Severo Ochoa, Getafe, Marqués de Valdecilla, Jerez y un largo etcetera. A todos vosotros muchas gracias por enriquecer con vuestras aportaciones nuestro día a día, a nivel educativo, personal y gastronómico.

También he tenido el placer de conocer a analistas y futuros analistas excepcionales de nuestro hospital, Carlos, Blanca, Fran, Lorena, Abia, Irene, Yohanna, Carlos, Cova y Zineb, con algunos de vosotros mantengo una excelente relación. Gracias por acordaros de mí para las cañitas y demás eventos que parecen un oasis en la rutina del día a día.

Por supuesto quiero agradecer a los residentes de hematología: Santi, Mili, Cris, Bea, Fani, Fiorella, Hugo, Gaby, Juan, Mar, Andrea, Erika, Williana, Sharon, María, Alexandra, Lorena, Carmen, Alejandro y Ademar, por todos los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del hospital. Un agradecimiento especial merece Mar por ser una de las personas con las que más he conectado en estos años y que sin duda hemos pasado muy buenos momentos juntos.

## AGRADECIMIENTOS

No podían faltar en esta lista los residentes de inmunología y compañía: Carlos, Laura, Arturo, Gorka, Roberto, Romina, Alejandro, Luzma, Miguel Ángel, Alejandro, Lidia, Belén, María, Virginia, Juliana, Alejandra, Merce, Keila, Natalia y Edgar. A todos vosotros daros las gracias porque me habeis hecho sentir como uno más, daros las gracias por todas las comidas, cenas, cañas, cumpleaños, despedidas, bodas, escapadas de fin de semana y eventos varios que hemos compartido a lo largo de los últimos años. Gracias Merce por todo lo vivido tanto en el hospital como en la carrera y porque nos traerás dentro de poco un pequeñín que nos alegre todos los momentos que compartiremos a partir de ahora. Gracias a Belén por compartir las angustias de la escritura de la tesis conmigo y porque posiblemente seas doctora casi a la vez que yo. Gracias, también a Barbara y Arnau, porque hicisteis que lo pasara en grande en Estados Unidos y porque sois dos personas estupendas.

A los bires, que decir de vosotros, que os llevo en la patatina, que no podré olvidar vuestra alegría, vuestras locuras, los viajes a Andalucía, a pinchito pinchito ni las raciones de oreja. Practicamente nos conocimos en una graduación celebrada en el “infierno”, pero desde entonces hemos vivido muchas cosas juntos. Nunca con unas pocas líneas podré expresar lo que significa para mí que me consideréis uno más, mil gracias por todo Alba, Belén, Bea, Álvaro, Iadira y Ana.

Je voudrais vous remercier, Ana et Álvaro, pour tous les moments que nous avons vécu ensemble. Nos cours à l'école de langues étrangères, les bières, nos voyages à la France et à la Belgique et un prochain voyage à l'Allemagne. Merci beaucoup mes pôtes!

Gracias a mis bioguilllos, Selene, Lorena, Vir, Sara, Miguel Ángel, Bego, Merce, Antonio, Sandra, Giaco, Ana, Noemi, Estefanía y Noé, porque ya hace más de 10 años que nos conocemos y hemos compartido todo tipo de penurias juntos en la

facultad y a pesar de que ya hace unos añitos que no nos vemos a diario mantenemos una sincera amistad que no es capaz de romper ni el tiempo ni la distancia. Algunos ya habeis pasado de la fase tesis a la fase bodas y espero que el resto os decidáis pronto y no quiero señalar a nadie. Gracias “neuronas team” por ser los que más entendéis los estados por los que se pasa a lo largo de la tesis y mucho animo para el último empujón del periodo doctorando.

Gracias a Miguel Ángel porque posiblemente te has llevado los peores ratos de mi tesis, aunque también hemos compartido infinidad de buenos momentos y lo seguiremos haciendo en el futuro. Quiero agradecerte todo lo que me has apoyado ya que estoy seguro de que no lo hubiera logrado sin tu ayuda. Este no es un punto final sino un punto de partida para un montón de éxitos que espero sigamos compartiendo.

“Necesito respirar y descubrir el aire fresco” para agradecer a Jorge, Manu, Dani, Pablo, Sandri, Patri, Fran, Sandra, María, Alba, Tamara y Sergio por los más de 20 años que llevamos compartiendo en el Valle del Tietar, algunos quizá unos añitos menos pero se os quiere igual. “Quiero tener *vuestra* presencia” durante muchos años más para seguir disfrutando de ese “sin vicio no puedo estar”, “si no hay pan para los tuyos”, las quedadas cinéfilas por Navidad y de las mejores bravas del mundo.

Gracias a Isabel, Miriam y Sergio porque a pesar de todos los años que han pasado desde que acabamos el instituto, de lo poco que nos vemos, de la distancia y de lo ajetreado de nuestras vidas, cuando nos juntamos parece que no hubiera pasado el tiempo. Espero a partir de ahora poder dedicaros más tiempo y seguir escribiendo nuestra historia juntos.

Ya más recientemente, he conocido a 3 personas maravillosas durante el máster, Raquel, José y Gery. Por supuesto en estos momentos tenía que acordarme de vosotros



## AGRADECIMIENTOS

porque realmente puedo decir que el máster mereció la pena, me llevo a grandes amigos de esa etapa de mi vida.

Muchas gracias a Fran, Alberto, Ansel, Rubén, Borja, José, Abrahan, Miguel y Nono porque sin duda estos años no hubieran sido lo mismo sin vosotros. Mil gracias por todas las chapas de la tesis que habeis aguantado. Me alegro un montón de haberos conocido y de todos los viajes y momentos especiales que hemos compartido. Espero seguir compartiendo experiencias y éxitos con todos vosotros.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano Mario su apoyo y ánimo constante. Sin vosotros no lo habría conseguido, estoy seguro de ello. Gracias a mi padre por haberme inculcado siempre que el esfuerzo, la paciencia y el trabajo duro al final tienen su recompensa.

Muchas gracias a mi hermano, por ser la alegría de la casa sobre todo cuando hemos pasado momentos malos. Se agradece que siempre tengas algo que decir o que hacer para que soltemos una sonrisa.

Por último, quiero dedicar el agradecimiento más importante a mi madre, porque me has demostrado amor, valentía, esfuerzo y dedicación entre otros muchos valores. Eres una de las personas más importantes para mí, has estado a mi lado en todos y cada uno de mis fracasos y de mis éxitos y sin duda gran parte de lo que soy te lo debo a tí. Nunca tendré palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho, haces y harás por mí.

Una vez más, ¡gracias a todos y cada uno de vosotros!

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



A	Adenina o adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BasoE	Eritroblastos basófilos
BFU-E	Unidad Formadora de Explosión ( <i>Burst</i> ) Eritroides
C	Citosina
CD	Codon
CFU-E	Unidad Formadora de Colonias Eritroides
CFU-S	Unidad Formadora de Colonias en el Bazo
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
Cys	Cisteina

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

dNTPs	DeoxiriboNucleotidos Trifosfato
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
EDTA	Ácido etilen-diaminotetracético
EPO	Eritropoyetina
EZ	E-Zone; Posición zonal en la electroforesis capilar de zona
G	Guanina o guanosina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina o glicocola
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
His	Histidina
HSC	Célula Stem Hematopoyética
Hto	Hematocrito
Ile	Isoleucina
IVS	Intrón

Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
nt	Nucleótido
OrthoE	Eritroblasto ortocromático
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Phe	Fenilalanina
PolyE	Eritroblasto policromatófilo
Pro	Prolina
ProE	Proeritroblasto
RBC	Eritrocitos o hematíes
RDW	Ancho de distribución eritrocitario
RIC	Rango Intercuartílico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tiempo de retención
Ser	Serina
<i>Stop</i>	Codon de terminación

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

T	Timina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U	Uracilo
Val	Valina
VCM	Volumen Corpuscular Medio

## ÍNDICE





<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. SUMMARY .....</b>	<b>15</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>III.1. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA.....</b>	<b>30</b>
<b>III.2 FUNCIÓN DE LA HEMOGLOBINA .....</b>	<b>32</b>
<b>III.3 TIPOS DE HEMOGLOBINAS .....</b>	<b>35</b>
<b>III.3.1 HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>III.3.1.1 Hb Gower I.....</b>	<b>35</b>
<b>III.3.1.2 Hb Gower II .....</b>	<b>35</b>
<b>III.3.1.3 Hb Portland I .....</b>	<b>36</b>
<b>III.3.2 HEMOGLOBINAS DEL NEONATO Y DEL ADULTO.....</b>	<b>36</b>
<b>III.3.2.1 Hemoglobina Fetal (Hb F) .....</b>	<b>36</b>
<b>III.3.2.2 Hemoglobina Bart (Hb B) .....</b>	<b>37</b>
<b>III.3.2.3 Hemoglobina A<sub>2</sub> (<math>\alpha_2\delta_2</math>).....</b>	<b>37</b>
<b>III.3.2.4 Hemoglobina A (<math>\alpha_2\beta_2</math>) .....</b>	<b>38</b>
<b>III.4 ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA Y ERITROPOYESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>III.4.1 ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA .....</b>	<b>39</b>
<b>III.4.2 ERITROPOYESIS .....</b>	<b>41</b>
<b>III.5 ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GENES GLOBÍNICOS..</b>	<b>44</b>
<b>III.5.1 ORGANIZACIÓN DEL CLUSTER <math>\alpha</math> GLOBINA .....</b>	<b>46</b>
<b>III.5.2 ESTRUCTURA DE LOS GENES <math>\alpha</math> DE GLOBINA.....</b>	<b>48</b>
<b>III.5.2.1 Secuencias reguladoras.....</b>	<b>48</b>
<b>III.5.2.2 Región promotora .....</b>	<b>50</b>
<b>III.5.2.3 Gen estructural .....</b>	<b>50</b>
<b>III.5.2.4 Región de Poliadenilación .....</b>	<b>52</b>
<b>III.6 EXPRESIÓN DE LOS GENES <math>\alpha</math> DE GLOBINA.....</b>	<b>53</b>
<b>III.6.1 TRANSCRIPCIÓN .....</b>	<b>54</b>

III.6.2 PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNm.....	56
III.6.3 TRADUCCIÓN.....	56
III.7 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLOBINA.....	57
III.8 ENSAMBLAJE DE LAS UNIDADES DE GLOBINA.....	58
III.8.1 AHSP: ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN GÉNICA .....	59
III.8.2 AHSP: ESTRUCTURA PROTEICA Y MECANISMO DE ACCIÓN	59
III.8.3 ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES DE LA HEMOGLOBINA	60
III.9 ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS Y SECUENCIA DE CADENAS DE GLOBINA.....	62
III.9.1 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES.....	62
III.9.2 TALASEMIAS.....	63
III.10 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES .....	64
III.10.1 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES POR MUTACIÓN SUPERFICIAL.....	65
III.10.2 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES INESTABLES .....	67
III.10.3 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES CON AFINIDAD ALTERADA POR EL OXÍGENO .....	68
III.10.4 METAHEMOGLOBINEMIAS O HB M.....	69
III.10.5 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES CON CAMBIO DE MOVILIDAD.....	70
III.10.6 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES NO GENÉTICAS .	70
III.11 TALASEMIAS .....	71
III.11.1 $\alpha$ -TALASEMIA .....	74
III.11.1.1 Epidemiología de las $\alpha$ -Talasemias .....	74
III.11.1.2 Formas clínicas.....	75
A) Portador silente .....	77
B) Rasgo talasémico .....	77
C) Enfermedad de la Hb H.....	78

D) Hidrops Fetalis por Hemoglobina Bart.....	79
<b>III.11.1.3 Bases moleculares de las <math>\alpha</math>-Talasemias .....</b>	<b>80</b>
A) $\alpha$ -Talasemia delección .....	81
A.1. $\alpha^+$ -Talasemia delección .....	81
A.2. $\alpha^0$ -Talasemia delección .....	84
B) $\alpha$ -Talasemia no delección .....	86
B.1. Mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm.....	87
B.1.a. Mutaciones que afectan al splicing .....	87
B.1.b. Mutaciones en la señal Poly A.....	88
B.2. Mutaciones que afectan a la traducción del ARNm .....	90
B.2.a. Mutaciones en el codon de iniciación .....	90
B.2.b. Mutaciones en el codon de terminación.....	92
B.2.c. Mutaciones de tipo <i>frameshift</i> .....	94
B.2.d. Mutaciones sin sentido.....	94
B.3. Mutaciones que afectan a la estabilidad postraducional.....	97
B.3.a. Variantes de cadena $\alpha$ inestables debido a mutaciones puntuales .	97
B.3.b. Variantes de cadena $\alpha$ inestables debido a pequeñas delecciones o inserciones .....	98
C) $\alpha$ -Talasemia por asociación de formas delección y no delección .....	100
D) $\alpha$ -Talasemia adquirida (ATSMD).....	101
E) $\alpha$ -Talasemia asociada a retraso mental.....	102
<b>III.11.1.4 Prevalencia de las <math>\alpha</math>-Talasemias en población española.....</b>	<b>103</b>
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>105</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>109</b>
<b>V.1 SUJETOS DE ESTUDIO .....</b>	<b>111</b>
<b>V.2 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>113</b>
<b>V.2.1 RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>113</b>

V.2.2 ESTUDIOS HEMOCITOMÉTRICOS .....	113
V.2.3 MORFOLOGÍA ERITROCITARIA .....	114
V.2.4 RECuento DE RETICULOCITOS .....	115
V. 2.5 OBSERVACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN .....	116
V.2.6 CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA A <sub>2</sub> Y HB F .....	117
V.2.7 CROMATOGRFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	118
V.2.8 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA DE HEMOGLOBINAS.	119
V.2.9 CROMATOGRFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE FASE REVERSA .....	121
V.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	123
V.3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	123
V.3.2 <i>SCREENING</i> DE $\alpha$ -TALASEMIA .....	125
V.3.3 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) .....	126
V.3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	129
V.3.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	131
V.3.6 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR.....	133
V.3.7 SECUENCIACIÓN .....	133
V.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	137
V.5 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> .....	138
VI. RESULTADOS.....	139
VI.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO .....	141
VI.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS .....	141
VI.1.1.1 Número de pacientes .....	141
VI.1.1.2 Distribución del sexo en los individuos estudiados .....	142
VI.1.1.3 Distribución de la edad en los individuos estudiados.....	142

VI.1.1.4 Distribución de la etnia en los individuos estudiados .....	143
VI.1.1.5 Lugar de residencia de los individuos de estudio .....	144
VI.1.2 DATOS DE DIAGNÓSTICO .....	145
VI.1.2.1 Diagnóstico clínico de los individuos de estudio .....	146
VI.1.2.2 Diagnóstico genético de los individuos de estudio .....	147
A) Alfa talasemias delección .....	147
B) Alfa talasemias no delección .....	148
C) Hemoglobinopatías estructurales .....	148
VI.2 ESTUDIO COMPARATIVO .....	151
VI.2.1 EDAD .....	152
VI.2.2 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN TALASEMIAS .....	152
VI.2.2.1 Alfa talasemias.....	152
A) 2 genes funcionales.....	154
B) 3 genes funcionales .....	156
VI.2.2.2 Alfa talasemia no delección .....	156
VI.2.3 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES.....	157
VI.2.3.1 Análisis de los porcentajes de hemoglobina por HPLC.....	160
VI.2.3.2 Análisis del tiempo de retención .....	160
VI.3 ESTUDIO <i>IN SILICO</i> .....	161
VII. DISCUSIÓN.....	163
VII.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	165
VII.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS .....	165
VII.1.1.1 Número de pacientes .....	166
VII.1.1.2 Distribución del sexo en los individuos estudiados.....	166
VII.1.1.3 Distribución de la edad en los individuos estudiados.....	167
VII.1.1.4 Distribución de la etnia en los individuos estudiados.....	167
VII.1.1.5 Lugar de residencia de los individuos de estudio .....	168

<b>VII.1.2 DATOS DE DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>169</b>
<b>VII.1.2.1 Diagnóstico clínico de los individuos de estudio .....</b>	<b>170</b>
<b>VII.1.2.2 Diagnóstico genético de los individuos de estudio .....</b>	<b>171</b>
A) Alfa talasemia deleción .....	171
B) Alfa talasemia no deleción.....	172
C) Hemoglobinopatías estructurales .....	177
<b>VII.2 ESTUDIO COMPARATIVO .....</b>	<b>182</b>
<b>VII.2.1 EDAD.....</b>	<b>182</b>
<b>VII.2.2 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN TALASEMIAS.....</b>	<b>183</b>
<b>VII.2.2.1 Alfa talasemias .....</b>	<b>183</b>
A) 2 genes funcionales.....	185
B) 3 genes funcionales .....	188
<b>VII.2.2.2 Alfa talasemia no deleción .....</b>	<b>189</b>
<b>VII.2.3 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES.....</b>	<b>190</b>
<b>VII.2.3.1 Análisis de los porcentajes de hemoglobina por HPLC .....</b>	<b>192</b>
<b>VII.2.3.2 Análisis del tiempo de retención.....</b>	<b>194</b>
<b>VII.3 ESTUDIO <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>195</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>199</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>203</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>211</b>
<b>X.1 COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADOS CON LA PRESENTE TESIS...</b>	<b>213</b>
<b>X.2 PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS .....</b>	<b>223</b>
<b>X.2.1 PRIMER CASO DE HB J-CAMAGÜEY ASOCIADO A <math>-\alpha^{3.7}</math> EN LA POBLACIÓN MUNDIAL .....</b>	<b>225</b>
<b>X.2.2 STUDY OF THREE FAMILIES WITH HB AGRINIO [<math>\alpha 29(\text{B}10)\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}</math>, CTG&gt;CCG (<math>\alpha 2</math>)] IN THE SPANISH POPULATION: THREE HOMOZYGOUS CASES .....</b>	<b>227</b>

<b>X.2.3 ASOCIACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GROENE HART CON LA HEMOGLOBINA J-PARÍS-I: PRIMER CASO EN ESPAÑA.....</b>	<b>234</b>
<b>X.2.4 HB CIBELES [<math>\alpha_2</math> CD25(B6) (Gly→Asp)]: A NOVEL ALPHA CHAIN VARIANT CAUSING ALPHA-THALASSEMIA.....</b>	<b>238</b>
<b>X.2.5 HB BURGOS (<math>\alpha_1</math> CD64(E13)(Asp→Asn)): UNA NUEVA VARIANTE DE HEMOGLOBINA DETECTADA DURANTE LA MONITORIZACIÓN DE LA DIABETES .....</b>	<b>241</b>
<b>X.2.6 HB NUNOBIKI [<math>\alpha_2</math> 141 (HC3) Arg&gt;Cys; HBA2:c.424C&gt;T] IN SPAIN: MUTATION DE NOVO OR ADQUIRED? .....</b>	<b>245</b>
<b>X.2.7 DELTA<sup>0</sup>-TALASEMIA POR INSERCIÓN DE 27 PARES DE BASES EN EL GEN <math>\delta</math>-GLOBINA CON DESCENSO DE LOS VALORES DE HEMOGLOBINA A<sub>2</sub>.....</b>	<b>249</b>
<b>X.2.8 HB CERVANTES, HB MARAÑÓN, HB LA MANCHA AND HB GOYA: DESCRIPTION OF 4 NEW HAEMOGLOBINOPATHIES .....</b>	<b>254</b>





<b>Figura 1: De la estructura primaria de la hemoglobina a la cuaternaria. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2: Curva de disociación de la hemoglobina. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3: Ontogenia de las cadenas de globina.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 4: Eritropoyesis en el adulto.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 5: Localización y ordenamientos de los <i>cluster</i> <math>\beta</math> (A) y <math>\alpha</math> (B). ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 6: Estructura de un gen de globina. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 7: Etapas de la expresión de los genes de globina. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 8: Vías para el ensamblaje de la Hb A. ....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 9: Distribución mundial de la <math>\alpha</math>-talasemia.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 10: Formas clínicas y su correlación con el fenotipo génico.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 11: Deleciones de un único gen <math>\alpha</math> causantes de <math>\alpha^+</math>-talasemia.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 12: Mecanismo de formación de la deleción <i>rightward</i> y la deleción <i>leftward</i>. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 13: Deleciones de ambos genes <math>\alpha</math> causantes de <math>\alpha^0</math>-talasemia. ....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 14: Deleciones causantes de <math>\alpha^0</math>-talasemia.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 15: Algoritmo para el diagnóstico molecular de <math>\alpha</math>-talasemia.....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 16: Cuerpos de inclusión al microscopio y teñidos con azul de cresil brillante. ....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 17: Etapas o reacciones de la metodología del MLPA.....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 18: Secuencias específicas en 3'UTR de ambos genes <math>\alpha</math> utilizadas para que la amplificación sea específica. ....</b>	<b>129</b>
<b>Figura 19: Numero de pacientes recibidos desglosados por año.....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 20: Edades en la muestra estudiada separada por franjas. ....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 21: Frecuencia de las etnias encontradas en la muestra estudiada. ....</b>	<b>143</b>
<b>Figura 22: Frecuencia de casos desglosada por comunidades autónomas de residencia de los pacientes. ....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 23: Frecuencia de los diferentes tipos de alfa talasemias. ....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 24: Frecuencia de los diferentes diagnósticos clínicos. ....</b>	<b>146</b>



Tabla I: Resumen de las $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm.....	89
Tabla II: Resumen de las $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan a la traducción del ARNm. ....	95
Tabla III: Resumen de las $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan a la estabilidad postraducional. ....	99
Tabla IV: Resumen de las $\alpha$ -talasemias delección encontradas en la población estudiada.....	147
Tabla V: Resumen de las $\alpha$ -talasemias no delección encontradas en la población estudiada.....	149
Tabla VI: Resumen de las hemoglobinopatías estructurales de cadena $\alpha$ encontradas en la población estudiada .....	150
Tabla VII: Número de casos de $\alpha$ -talasemia no delección y hemoglobinopatías estructurales de cadena $\alpha$ desglosados por Comunidad Autónoma de residencia	151
Tabla VIII: Resumen hematimétrico de los diferentes diagnósticos de alfa talasemia a nivel genotípico. ....	153
Tabla IX: Resumen hematimétrico de la alfa talasemia delección para 2 genes funcionales en cis o en trans. ....	154
Tabla X: Comparación de medias o medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias delección y no delección con 2 genes funcionales.....	155
Tabla XI: Comparación de medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias delección y no delección con 3 genes funcionales. ....	156
Tabla XII: Comparación de medias o medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias no delección heterocigotas en función del gen afectado. ....	157
Tabla XIII: Resumen hematimétrico y bioquímico de las diferentes hemoglobinopatías estructurales.....	158
Tabla XIV: Comparación de medianas de los porcentajes de hemoglobina por HPLC entre las hemoglobinopatías estructurales atendiendo al gen afectado.....	160
Tabla XV: Tabla de contingencia de las variables categóricas RT y Balance de carga de la hemoglobinopatía.....	161
Tabla XVI: Resumen de los análisis <i>in silico</i> llevados a cabo por PolyPhen-2 y SIFT. ....	162



## **I. RESUMEN**



## Introducción

Las talasemias son un grupo heterogéneo de anemias hereditarias desde el punto de vista molecular, clínico y hematológico; caracterizadas por la disminución o ausencia total de síntesis de una o varias cadenas de globina. La cadena sintetizada en menor cuantía es, por lo general, rigurosamente normal en su composición y estructura.

En las talasemias, se encuentra una anemia microcítica e hipocroma, a la que se le añade un determinado componente hemolítico. Esta anemia se asocia, en el paciente homocigoto a una sobrecarga férrica, en parte debida al soporte trasfusional, así como a un incremento de la absorción de hierro por la eritropoyesis ineficaz.

Las hemoglobinopatías estructurales son desórdenes hereditarios de la síntesis de la hemoglobina, en los cuales se ve alterada la secuencia de una de las cadenas de globina que forman la hemoglobina. Se trata de una alteración cualitativa en la síntesis de hemoglobina, es decir, existe una variación en la estructura primaria de una o varias de las subunidades que forman el tetrámero de la hemoglobina.

Se han descrito más de 1.000 variantes de hemoglobina, de las cuales, alrededor de la mitad no dan lugar a patología alguna. En los casos patológicos las mutaciones pueden producir polimerización de la hemoglobina anómala por alteración de la carga superficial (Hb S, Hb C), precipitación de la hemoglobina dentro del hematíe (hemoglobinas inestables), cambios en la afinidad por el oxígeno (poliglobulia y cianosis) o aumento de la oxidación del hierro del grupo hemo (metahemoglobinas o Hb M). Además, las hemoglobinopatías pueden tener alterada su movilidad electroforética lo cual contribuye a su identificación tanto de forma intencionada como casual.



## Objetivos

1. Analizar la distribución de variables de tipo demográfico tales como el sexo, la edad o la etnia de los pacientes con  $\alpha$ -talasemia y/o hemoglobinopatías estructurales en nuestro medio.
2. Comprobar la incidencia de  $\alpha$ -talasemia no delección dentro de los casos de  $\alpha$ -talasemia para conocer si se ajusta a lo descrito en la literatura para otras poblaciones.
3. Determinar la heterogeneidad molecular de la  $\alpha$ -talasemia y de las hemoglobinopatías estructurales en nuestro entorno.
4. Establecer diferencias hematimétricas entre los diferentes diagnósticos de  $\alpha$ -talasemia a nivel genotípico, haciendo un estudio más exhaustivo de la  $\alpha$ -talasemia no delección.
5. Establecer un perfil bioquímico de separación tanto por HPLC de intercambio iónico como por electroforesis capilar para las diferentes hemoglobinopatías estructurales y analizar las diferencias tanto en cuantía como en lugar de separación.
6. Pronosticar *in silico* cuando una hemoglobinopatía será potencialmente dañina y cuando será silente para las nuevas hemoglobinopatías descritas en este trabajo y comprobar cuál de los métodos es más útil y fiable.

## Materiales y métodos

1. Sujetos de estudio: Desde enero de 2009 hasta diciembre de 2014 se han estudiado 1.623 individuos procedentes de diferentes regiones españolas. Entre los sujetos de estudio se encuentran tanto población nativa como inmigrante. Se trata de un estudio ambispectivo. 1.470 individuos son pacientes con anemia microcítica e hipocroma, 176 sujetos presentaron un pico de hemoglobina anómalo y finalmente, 23 casos fueron estudiados simultáneamente para el diagnóstico de alfa talasemias y de hemoglobinopatías estructurales.

2. Técnicas de diagnóstico: El diagnóstico de  $\alpha$ -talasemia en el laboratorio precisó de los siguientes estudios: Estudio hemocitométrico convencional con morfología de la serie roja, recuento de reticulocitos, determinación de la Hb A<sub>2</sub> y Hb F por HPLC de intercambio iónico y cuantificación de los cuerpos de inclusión de Hb H. Para el diagnóstico de las hemoglobinopatías estructurales: a parte del HPLC de intercambio iónico, electroforesis capilar de hemoglobinas y HPLC de fase reversa.
3. Técnicas de biología molecular: El diagnóstico molecular se ha realizado mediante el siguiente algoritmo: Extracción automática del ADN genómico contenido en los núcleos de los leucocitos de sangre periférica, descartar grandes deleciones y las mutaciones puntuales más frecuentes empleando el método del  *$\alpha$ -globin StripAssay*<sup>®</sup>, descartar otras grandes deleciones mediante *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) y finalmente, secuenciación automática según el método de Sanger.
4. Análisis estadístico: Los paquetes estadísticos utilizados para el análisis fueron SPSS *Statistics* 19. Las variables cualitativas se representan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen con su media y desviación estándar. Para las variables normales se utilizó el test de la T de Student o el ANOVA. Las variables que no cumplen el criterio de normalidad se representan mediante su mediana y el rango intercuartílico y se compararon mediante pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). Finalmente, las comparaciones de variables cualitativas se realizaron mediante tablas de contingencia y el estadístico de Chi-cuadrado de Pearson. Para todas las pruebas se acepta un nivel de significación del 5%.
5. Análisis *in silico*: Las hemoglobinopatías descritas por primera vez en el presente trabajo han sido analizadas mediante los Software SIFT y PolyPhen-2 para establecer un *score* que determine si las nuevas variantes son benignas

(hemoglobinopatías estructurales) o potencialmente dañinas (hemoglobinopatías inestables que cursan con un síndrome talasémico).

## **Resultados y discusión**

### **1. Estudio descriptivo:**

a. Datos demográficos: Existe un porcentaje de 8,44% de sujetos de los cuales se desconoce el sexo y un 22,3% en los que la edad es desconocida. Se observa una tendencia al alza en el número de muestras desde el año 2010 hasta el año 2013, momento en el que se estabiliza el número de pacientes. El balance de sexos encontrado en este estudio ha sido equilibrado. La media de edad de los sujetos estudiados es 30,95 años, no obstante, al estratificar la edad de los sujetos se observa que la mayoría de individuos son diagnosticados a edades tempranas.

Se ha encontrado un porcentaje mayoritario de caucásicos (77,5%) lo que se corresponde con la población mayoritaria residente en España y a continuación destacan los asiáticos (7,4%), que proceden de zonas endémicas para la  $\alpha$ -talasemia. En el estudio desglosado por Comunidades Autónomas destacan las frecuencias obtenidas en Madrid (49,7%), Castilla La Mancha (14,8%), Castilla y León (9,5%), Andalucía (7,9%) y País Vasco (5,6%).

b. Datos de diagnóstico: Las  $\alpha$ -talasemias suponen casi 10 veces más que las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  encontradas. Presumiblemente este hecho es debido a que la mayoría de las hemoglobinopatías estructurales son clínicamente silentes. Dentro de las  $\alpha$ -talasemias, se han encontrado, 1282 casos (87,2%) de  $\alpha$ -talasemias delección, 172 casos (11,7%) de  $\alpha$ -talasemias no delección y 16 individuos (1,1%) con la combinación simultánea de  $\alpha$ -talasemias delección y no delección. Esto supone aproximadamente un 12% de  $\alpha$ -talasemia no delección,

que tradicionalmente ha sido incluida como causa molecular poco frecuente de  $\alpha$ -talasemia.

i. *Diagnóstico clínico:* Dentro de los diagnósticos clínicos de  $\alpha$ -talasemia tan sólo se han contabilizado 19 casos graves (1 *Hidrops fetalis* y 18 casos de enfermedad de la Hb H), 1.200 rasgos talasémicos y 160 portadores silentes. Los casos graves son tan poco frecuentes porque a día de hoy está bastante extendido el diagnóstico prenatal y el consejo genético en parejas de riesgo.

Por lo que respecta a las hemoglobinopatías estructurales, sólo destacan 2 casos de hemoglobinopatías con baja afinidad por el oxígeno y 1 caso de hemoglobina M que son los únicos pacientes con sintomatología, mientras que los 150 restantes son hemoglobinopatías silentes. Los 23 pacientes no contabilizados son hemoglobinopatías estructurales silentes asociadas simultáneamente con alfa talasemia.

ii. *Diagnóstico genético:* Se han encontrado 1.298 individuos portadores de  $\alpha$ -talasemia delección, de los cuales 905 fueron portadores heterocigotos, 366 homocigotos y 27 dobles heterocigotos. En los casos homocigotos y en los heterocigotos la delección más frecuente es la 3,7Kb representando un 28,1% y 58,5% del total respectivamente.

Se han encontrado 188 pacientes portadores de  $\alpha$ -talasemia no delección, de los cuales 185 fueron heterocigotos y 3 homocigotos. Entre los homocigotos se observaron 2 casos de Hb Agrinio y 1 de la mutación Hph. En este estudio se han localizado 36 alteraciones responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección diferentes, lo que revela la alta heterogeneidad en la población analizada, no obstante, la mutación más frecuente (Hph) supone

un 34,6% de los pacientes. En los resultados destaca la elevada frecuencia de la Hb Groene Hart (20,7%) que tradicionalmente había sido asociada con la población magrebí pero que en el presente estudio hemos encontrado también en población autóctona. Por último, destacar que en este estudio han sido descritas 9 alteraciones nuevas responsables de  $\alpha$ -talasemia no deleción: Hb Cibeles, Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena, Hb El Retiro, 3'UTR +778 y Hb Clinic pero no en  $\alpha_1$  sino en  $\alpha_2$ .

176 pacientes eran portadores de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , de los cuales 173 fueron heterocigotos y 3 homocigotos. Entre los homocigotos se observaron 1 caso de Hb Le Lamentin, 1 de Hb J-París y 1 de Hb Burgos. En este estudio se han localizado 35 alteraciones responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  diferentes, no obstante, la mutación más frecuente (Hb Le Lamentín) supone un 25% de los pacientes y la segunda (Hb J-París) un 20%. Por último, destacar que en este estudio han sido descritas 5 alteraciones nuevas responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ : Hb Burgos, Hb La Mancha, Hb Goya, Hb Puerta del Sol y Hb El Bonillo.

En el caso de las  $\alpha$ -talasemias no deleción, la mutación mayoritaria en Madrid, Castilla y León, Andalucía y Extremadura es la Hph que a nivel global también era la mutación más frecuente. En el caso de las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , la mutación mayoritaria en Madrid es la Hb G-Philadelphia lo que pone de manifiesto que es una de las regiones que más inmigrantes tiene. Por otro lado, en Castilla La Mancha la

variante más frecuente es la Hb Le Lamentin, mientras que en Castilla León y Cantabria es la Hb J-París.

2. Estudio comparativo:

a. Edad: Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con talasemia y los portadores de hemoglobinopatías estructurales (28 años *versus* 67 años), así como para el grupo de pacientes que presentan simultáneamente talasemia y hemoglobinopatías estructurales frente a los que sólo tienen hemoglobinopatías estructurales (28,5 años *versus* 67 años).

b. Datos hematimétricos:

i. *Alfa talasemias:* Se estudiaron los casos de alfa talasemia delección con 2 genes funcionales y se observaron diferencias en el Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Ancho de Distribución de Eritrocitos (RDW). Los 2 primeros fueron más bajos en el grupo de pacientes con una delección  $\alpha^0$  mientras que el RDW fue más bajo en los pacientes con una delección  $\alpha^+$  en homocigosis.

Los pacientes con 2 genes funcionales se agruparon en función de su genotipo: pacientes con alfa talasemia delección [ $(--/\alpha\alpha)$  ó  $(-\alpha/-\alpha)$ ], con alfa talasemia no delección [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  ó  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] y con alfa talasemia delección y no delección simultáneamente o grupo mixto  $(-\alpha/\alpha^T\alpha)$ . Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos para el número de eritrocitos, cifra de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), RDW, reticulocitos y porcentaje de Hb F. Los resultados muestran que el grupo que presentan  $\alpha$ -talasemia no delección tienen parámetros hemátimétricos más graves: Hb y Hto más bajos y RDW y reticulocitos más altos.

Los pacientes con 3 genes funcionales fueron divididos en 2 categorías atendiendo a si la mutación responsable de alfa talasemia era puntual ( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ) o una delección ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el número de eritrocitos, VCM, HCM y los niveles de Hb A<sub>2</sub>. Los parámetros nos indican que la  $\alpha$ -talasemia debida a mutaciones puntuales tiene una mayor repercusión clínica. Los pacientes con  $\alpha$ -talasemia no delección y 3 genes funcionales fueron divididos en 2 grupos atendiendo a si la mutación se encuentra en el gen  $\alpha_2$  o en el gen  $\alpha_1$ . En estos pacientes se alcanzaron diferencias a nivel estadístico para el número de hematíes, HCM, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) y los niveles de HbA<sub>2</sub>. Los parámetros nos indican que los pacientes con mutaciones en el gen  $\alpha_2$  muestran un fenotipo ligeramente más severo.

ii. *Hemoglobinopatías estructurales:* Los niveles de Hb A<sub>2</sub> varían desde el 0,6% hasta el 3,5%. Estos valores anormalmente bajos no son reales, ya que a partir de la cadena  $\alpha$  mutada se forma también su Hb A<sub>2</sub> correspondiente que tiene propiedades de separación diferentes y que por lo tanto no es cuantificada. Los niveles de Hb F varían entre el 0% y el 7,2%. El porcentaje de Hb X oscila entre el 6,2% y el 54,5% debido al grado de inestabilidad de las hemoglobinopatías, a la graduación natural por los niveles de expresión diferencial de los genes  $\alpha$  y a la dosis génica en la que se encuentre la alteración. El grupo de homocigotos fue el que mostró los porcentajes de Hb X más altos con una mediana del 47,4%, mientras que el grupo de hemoglobinopatías heterocigotas para el gen  $\alpha_1$  fue en el que se obtuvieron los porcentajes inferiores (mediana de 17%).

Respecto al estudio cromatográfico por HPLC de intercambio iónico, las hemoglobinas fueron divididas en 3 categorías en función del RT: rápidas ( $RT < 2,1$  min), normales ( $2,1 \text{ min} < RT < 3,1$  min) y lentas ( $RT > 3,1$  min). Por otro lado, las hemoglobinopatías estructurales fueron divididas en 3 categorías: hemoglobinopatías de balance neto de carga “más negativo”, de carga “más positivo” y de carga “más apolar”. Las 2 variables se enfrentaron en una tabla de contingencia, obteniéndose una correlación prácticamente al 100%. Todas las hemoglobinopatías de balance neto de carga “más positivo” son englobadas dentro de la categoría de variantes lentas, todas las hemoglobinopatías de carga “más apolar” son las que poseen un RT muy próximo al de la Hb A y todas las hemoglobinopatías de carga “más negativa” se clasificarían como variantes rápidas.

3. Estudio *in silico*: En medicina, los métodos *in silico* se usan para la predicción y validación de técnicas sobre la salud humana. En nuestro caso se han utilizado dos programas diferentes PolyPhen-2 y SIFT. El análisis *in silico*, sólo fue realizado en aquellas variantes, no descritas con anterioridad, cuya alteración se debe a mutaciones puntuales. Ambos programas clasificaron correctamente 5 hemoglobinopatías: Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Marañón, Hb Valdecilla y Hb Gran Vía. Por otro lado, PolyPhen-2 clasificó correctamente la Hb El Bonillo mientras que por SIFT la clasificación fue errónea. En contraposición SIFT acertó con la Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes y Hb Macarena mientras que PolyPhen-2 se equivocó. Finalmente, con la Hb La Mancha se realizó una predicción errónea por parte de ambos métodos. En concordancia con estos resultados, en nuestras variantes analizadas ha funcionado mejor el algoritmo de SIFT.



## Conclusiones

1. La mayoría de los individuos son diagnosticados a edades tempranas, sobre todo en los casos graves y en las  $\alpha$ -talasemias, predominan los caucásicos y en menor medida los asiáticos.
2. La  $\alpha$ -talasemia no delección supone un 12% de la  $\alpha$ -talasemia en nuestro medio representando un valor más alto de lo descrito hasta la actualidad.
3. La delección más frecuente en nuestro entorno fue la 3,7Kb lo que es habitual en poblaciones mediterráneas seguida por las asiáticas --SEA y --FIL. Las alteraciones responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección más representadas son la Hph y la Hb Groene Hart y en el caso de las hemoglobinopatías estructurales la Hb Le Lamentin y la Hb J-París. No obstante, existe una alta heterogeneidad en la población analizada con el hallazgo de 36 y 35 alteraciones diferentes responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección y de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  respectivamente.
4. Las delecciones  $\alpha^0$  (--/ $\alpha\alpha$ ) tienen una hematimetría más severa que las delecciones  $\alpha^+$  en homocigosis (- $\alpha$ / $\alpha$ ). La  $\alpha$ -talasemia no delección con 2 genes funcionales [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  ó  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] tiene parámetros hematimétricos más graves que los mismos genotipos ocasionados por delecciones. La  $\alpha$ -talasemia no delección es más grave que la  $\alpha$ -talasemia delección. Los pacientes con mutaciones puntuales en el gen  $\alpha_2$  muestran un fenotipo ligeramente más severo.
5. En este estudio han sido descritas 9 alteraciones nuevas responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección: Hb Cibeles, Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena, Hb El Retiro, 3'UTR +778 y Hb Clinic de  $\alpha_2$ . También se han encontrado 5 alteraciones nuevas responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ : Hb Burgos, Hb La Mancha, Hb Goya, Hb Puerta del Sol y Hb El Bonillo.

6. En el análisis *in silico*, ambos programas clasificaron correctamente la Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Marañón, Hb Valdecilla y Hb Gran Vía. Al realizar la clasificación de la Hb El Bonillo, Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes, Hb Macarena y Hb La Mancha uno o ambos métodos *in silico* cometieron errores. El mejor algoritmo fue SIFT con un porcentaje de aciertos del 80%.

## RESUMEN

## **II. SUMMARY**



**Introduction**

Thalassaemias are a heterogeneous group of inherited anaemias from molecular, clinical and haematological points of view that are characterized by the reduction or total absence of the synthesis of one or more globin chains. The chains that are synthesized, to a lesser extent, are usually absolutely normal in composition and structure.

Thalassaemias are microcytic and hypochromic anaemias that have a certain haemolytic component. These types of anaemia occur in patients who are homozygous with iron overload due partly to transfusion support and to an increased iron absorption by ineffective erythropoiesis.

Structural haemoglobinopathies are inherited disorders of haemoglobin synthesis, in which the sequence of one of the globin chains, which form the haemoglobin, is altered. In other words, there is a qualitative alteration in haemoglobin synthesis that represents a variation in the primary structure of one or more of the subunits that form the haemoglobin tetramer.

More than 1,000 haemoglobin variants have been described, of which approximately half do not result in pathology. In pathological cases, mutations may produce an abnormal polymerization of haemoglobin by altering the surface charge (Hb S, Hb C), precipitation of haemoglobin in the red blood cell (unstable haemoglobins), changes in oxygen affinity (polycythaemia and cyanosis) or increased oxidation of the heme iron group (methaemoglobins or Hb M). In addition, haemoglobinopathies may alter their electrophoretic mobility, which both intentionally and casually contributes to their identification.

## SUMMARY

### Objectives

1. To analyze the distribution of demographic variables such as sex, age or ethnicity of patients with  $\alpha$ -thalassaemia and/or structural haemoglobinopathies in our region.
2. To examine the incidence of non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia within all cases of  $\alpha$ -thalassaemia to discern whether it conforms to the results of previous studies in other populations.
3. To determine the molecular heterogeneity of  $\alpha$ -thalassaemia and structural haemoglobinopathies in our region.
4. To set haematological differences between the different diagnoses of  $\alpha$ -thalassaemia at the genotypic level by making a more thorough study of non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia.
5. To establish a biochemical separation profile by both ion exchange HPLC and capillary electrophoresis for different structural haemoglobinopathies and to analyze the differences in both the amount and the separation place.
6. To forecast *in silico* when a haemoglobinopathy may be harmful or silent in new haemoglobinopathies described in this work and to determine which method is the most useful and reliable.

### Materials and methods

1. Studied Subjects: From January 2009 to December 2014, 1,623 individuals were studied from different Spanish regions. The studied subjects comprised both native and immigrant populations. It was an ambispective study comprising 1,470 patients with hypochromic and microcytic anaemia, 176 subjects with a peak of abnormal haemoglobin and 23 patients who were studied for simultaneous  $\alpha$ -thalassaemias and structural haemoglobinopathies diagnosis.

2. Diagnostic techniques: Laboratory diagnosis of  $\alpha$ -thalassaemia required the following studies: a conventional haemocytometer study, including red cell morphology analysis, the reticulocyte count, the determination of Hb A<sub>2</sub> and Hb F by ion exchange HPLC and quantification of the Hb H inclusion bodies. The diagnosis of structural haemoglobinopathies required capillary electrophoresis of haemoglobins and reversed phase or globin chain HPLC.
3. Molecular biology techniques: Molecular diagnostics were performed using the following process: automatic extraction of the DNA included in the nucleus of peripheral blood leucocytes; discarding the most frequent large deletions and point mutations using the  $\alpha$ -globin StripAssay<sup>®</sup>; discarding other large deletions by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA); and sequencing according to the Sanger method.
4. Statistical analysis: The statistical package used for the analysis was SPSS Statistics 19. Qualitative variables were represented by their frequency distribution. Quantitative variables are summarized with the mean and standard deviation. Student's t-test or ANOVA was used for normal variables. Variables that did not meet the criteria of normality were represented by their median and interquartile range and compared using non-parametric tests (Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test). Finally, comparisons of qualitative variables were performed using contingency tables and the Pearson chi-squared statistic. For all of the tests, a level of significance of 5% was accepted.
5. In silico analysis: The haemoglobinopathies first described in this paper were analysed using SIFT and PolyPhen-2 software to establish a score that determines whether the new variants are benign (structural haemoglobinopathies) or potentially harmful (unstable haemoglobinopathies for thalassaemia syndrome).



## Results and discussion

### 1. Description study:

a. Demographics: In 8.44% of the subjects, the sex was unknown, and the age was unknown in 22.3% of the subjects. An upward trend in the number of samples was observed from 2010 to 2013, at which time, the number of patients was stable. Gender balance was found in this study. The mean age of the studied subjects was 30.95 years; however, when stratifying by the age of the subjects, most of the individuals were diagnosed at an early age.

It was found that most Caucasians (77.5%), which corresponded to the main population living in Spain, followed by Asians (7.4%), came from areas endemic for  $\alpha$ -thalassaemia. When the incidence of  $\alpha$ -thalassaemia was stratified by autonomous community, the results emphasized the frequencies obtained in Madrid (49.7%), Castilla La Mancha (14.8%), Castilla y León (9.5%), Andalusia (7.9%) and the Basque Country (5.6%).

b. Diagnostic data:  $\alpha$ -thalassaemia was presented almost 10 times more than structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain. Presumably, this is because most structural haemoglobinopathies are clinically silent. Among the  $\alpha$ -thalassaemia cases, 1,282 cases (87.2%) were deletional  $\alpha$ -thalassaemia, 172 cases (11.7%) were non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia, and 16 cases (1.1%) were deletional and non-deletional  $\alpha$ -thalassaemias simultaneously. Thus, approximately 12% of the cases were non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia, which traditionally has been included as a rare molecular cause of  $\alpha$ -thalassaemia.

i. *Clinical diagnosis:* Only 19 serious cases (1 *hydrops fetalis* and 18 cases of Hb H disease), 1,200 thalassaemias traits and 160 thalassaemia silent carriers were recorded within the  $\alpha$ -thalassaemia clinical diagnostics. Severe

cases are very rare because prenatal diagnosis and genetic counselling in couples at risk are widespread now.

Regarding structural haemoglobinopathies, there were only 2 cases of haemoglobinopathies with low oxygen affinity and 1 case of haemoglobin M, which represented the only symptomatic patients; the remaining 150 were silent haemoglobinopathies. The 23 unaccounted patients had silent structural haemoglobinopathies that were associated with simultaneous  $\alpha$ -thalassaemia.

ii. *Genetic diagnosis:* A total of 1,298 carriers of the  $\alpha$ -thalassaemia deletion were identified, of whom 905 were heterozygous carriers, 366 were homozygous, and 27 were double heterozygous. In the homozygous and heterozygous cases, the 3.7Kb deletion was the most frequent and represented 28.1% and 58.5% of the total, respectively.

A total of 188 patients with non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia were found, of whom 185 were heterozygous and 3 were homozygous. Among the homozygous cases, 2 Hb Agrinio and 1 Hph mutation were observed. In this study, we identified 36 different alterations responsible for non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia, thus revealing the high heterogeneity in the population tested; however, the most frequent mutation (Hph) represented 34.6% of the patients. The results highlighted the high frequency of Hb Groene Hart (20.7%) that traditionally has been associated with the North African population but was also found in the native population in this study. Finally, it is important to note that this study described 9 new alterations responsible for non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia: Hb Cibeles, Hb Cervantes,

## SUMMARY

Hb Marañón, Hb Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena, Hb El Retiro, 3'UTR +778 and Hb Clinic of alpha2.

A total of 176 patients had structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain, of whom 173 were heterozygous and 3 were homozygous. Among the homozygous cases, 1 Hb Le Lamentin, 1 Hb J-Paris and 1 Hb Burgos were observed. In this study, we found 35 different alterations responsible for structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain; however, the most frequent mutation (Hb Le Lamentin) represented 25% of the patients, and the second most frequent (Hb J-Paris) represented 20% of the patients. Finally, five new alterations were described to be responsible for structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain: Hb Burgos, Hb La Mancha, Hb Goya, Hb Puerta del Sol and Hb El Bonillo.

Regarding non-deletional  $\alpha$ -thalassaemias, the most frequent mutation in Madrid, Castilla y Leon, Andalusia and Extremadura was the Hph mutation, which was also the most frequent mutation in global cases. In the case of structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain, the most frequent mutation in Madrid was the Hb G-Philadelphia, thus indicating one of the regions that most immigrants have. In contrast, in Castilla La Mancha, the most common variant was the Hb Le Lamentin; in Castilla Leon and Cantabria, the most common variant was the Hb J-Paris.

### 2. Comparative study:

- a. Age: Statistically significant differences between the group of patients with thalassaemia and structural haemoglobinopathies carriers (28 years versus 67 years, respectively) and between the group of patients who showed thalassaemia

and structural haemoglobinopathies simultaneously and those only with structural haemoglobinopathies were observed (28.5 years versus 67 years, respectively).

b. Hematimetric data:

*i. Alpha thalassaemia:*  $\alpha$ -Thalassaemia deletion cases with 2 functional genes were studied, and differences in the MCV, MCH and RDW were observed. The first 2 parameters were lower in the group of patients with a deletion  $\alpha^0$ , whereas the RDW was lower in patients with a homozygous deletion  $\alpha^+$ .

Patients with two functional genes were grouped according to their genotype: deletional  $\alpha$ -thalassaemia patients [ $(--/\alpha\alpha)$  or  $(-\alpha/-\alpha)$ ], non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  or  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] and non-deletional and deletional  $\alpha$ -thalassaemia simultaneously or mixed group  $(-\alpha/\alpha^T\alpha)$ . Statistically significant differences among the 3 groups were observed in the number of erythrocytes, haemoglobin level, haematocrit, RDW, reticulocyte and percentage of Hb F. The results showed that the group with non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia showed more severe hematimetric parameters: Hb and haematocrit (the lowest) and RDW and reticulocytes (the highest).

Patients with 3 functional genes were divided into two categories based on whether the mutation responsible for  $\alpha$ -thalassaemia was punctual ( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ) or a deletion  $(-\alpha/\alpha\alpha)$ , and statistically significant differences in the number of erythrocytes, MCV, MCH and Hb A<sub>2</sub> levels were obtained. The parameters indicated that  $\alpha$ -thalassaemia due to point mutations have a greater clinical impact. Non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia patients with 3 functional genes were divided into two groups according to whether the mutation was in the  $\alpha_2$  gene or  $\alpha_1$  gene. In these patients, statistically

significant differences in the number of erythrocytes, MCH, MCHC and Hb A<sub>2</sub> levels were observed. The parameters indicated that patients with mutations in the  $\alpha_2$  gene show a slightly more severe phenotype.

*ii. Structural haemoglobinopathies:* The Hb A<sub>2</sub> levels ranged from 0.6% to 3.5%. These abnormally low values were not realistic because Hb A<sub>2</sub> is also formed from a mutated  $\alpha$  chain and has different separation properties; hence, Hb A<sub>2</sub> cannot be unquantified. The Hb F levels vary between 0% and 7.2%. The percentage of Hb X ranges between 6.2% and 54.5% due to the degree of instability of the haemoglobinopathies, and the natural graduation due to the differential expression levels of  $\alpha$  genes and dose at which the alteration is found. The homozygous group showed the highest percentages of Hb X, with a median of 47.4%, whereas lower percentages (median 17%) were obtained in the group of heterozygous haemoglobinopathies for the  $\alpha_1$  gene.

Patients were divided into 3 categories according to the RT by HPLC: fast (RT <2.1 min), normal (2.1 min <RT <3.1 min) and slow (RT >3.1 min). On the other hand, structural haemoglobinopathies were divided into 3 categories: haemoglobinopathies whose net charge balance was "more negative", "more positive", and "more apolar". The 2 variables in a contingency table yielded a correlation of almost 100%. All haemoglobinopathies whose net charge balance was "more positive" were included within the category of slow variations, all of the "more apolar" haemoglobinopathies were those with the RT very close to that of Hb A, and all of the "more negative" haemoglobinopathies were classified as fast variants.

3. *In silico* study: *In silico* methods are used for the prediction and validation of techniques on human health. In our case, two different programs, PolyPhen-2 and SIFT, were used. *In silico* analysis was performed only on those variants that had not been described yet and if the alteration was a point mutation. Both programs properly classified 5 haemoglobinopathies: Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Marañón, Hb Gran Vía and Hb Valdecilla. Moreover, PolyPhen-2 classified Hb El Bonillo correctly, but the SIFT classification was incorrect. By contrast, SIFT yielded correct hits with Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes and Hb Macarena, whereas the PolyPhen-2 classification was incorrect. Finally, an erroneous prediction by both methods in Hb La Mancha was performed. Consistent with these results, in our analyzed variants, the SIFT algorithm worked best.

### **Conclusions**

1. Most individuals were diagnosed with  $\alpha$ -thalassaemia at an early age, particularly in severe cases. Further, the disease occurred predominantly in Caucasians and, to a lesser extent, in Asians.
2. Non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia represented 12% of all  $\alpha$ -thalassaemias in our region, representing a higher value than described to date.
3. The most common deletion in our region was the 3.7Kb deletion that is common in Mediterranean populations, followed by Asian –SEA and –FIL. The alterations responsible for non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia are most represented by the Hph and Hb Groene Hart and, in the case of structural haemoglobinopathies, Hb Le Lamentin and Hb J-Paris. However, there is a high heterogeneity in the population analysed with the discovery of 36 and 35 different alterations responsible for non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia and structural haemoglobinopathies of the  $\alpha$  chain, respectively.

## SUMMARY

4.  $\alpha^0$  deletions ( $--/\alpha\alpha$ ) have more severe parameters than homozygous deletions  $\alpha^+$  ( $-\alpha/-\alpha$ ). Non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia with 2 functional genes [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  or  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] have more serious parameters than the same genotypes caused by deletions. Non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia is more serious than the  $\alpha$ -thalassaemia deletion. Patients with point mutations in the  $\alpha_2$  gene show a slightly more severe phenotype.

5. In this study 9 new alterations causing non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia have been described: Hb Cibeles, Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena, Hb El Retiro, 3'UTR +778 y Hb Clinic de  $\alpha_2$ . Also, 5 alterations responsible for structural haemoglobinopathies of  $\alpha$  chain have been found: Hb Burgos, Hb La Mancha, Hb Goya, Hb Puerta del Sol y Hb El Bonillo.

6. Both programs properly classified Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Marañón, Hb Valdecilla and Hb Gran Vía. The classification of Hb El Bonillo, Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes, Hb Macarena and Hb La Mancha led to errors by one or both *in silico* methods. The best algorithm is SIFT with a hit percentage of 80%.

### **III. INTRODUCCIÓN**





Desde sus orígenes, el ser humano ha tratado de explicar la realidad y los acontecimientos trascendentales que en ella tienen lugar como la vida, la muerte o la enfermedad. A lo largo de la historia, el hombre ha tenido que convivir necesariamente con la enfermedad y a pesar del gran interés que suscitó el conocimiento científico y la medicina en civilizaciones antiguas como los griegos o los romanos, no sería hasta el siglo XIX cuando se empezasen a poner los pilares de la medicina moderna.

En 1865 ve la luz el trabajo de Gregorio Mendel sobre las Leyes de Mendel o de la “Herencia Biológica” que abriría un nuevo campo de estudio para conocer la etiología de las enfermedades.

A partir de ese momento se fueron sucediendo los avances en el campo de la genética hasta llegar a una ciencia tal y como la conocemos hoy en día, que nos permite establecer una relación directa entre los genes y las enfermedades hereditarias.

Éstas son aquel conjunto de enfermedades genéticas cuya característica principal es su supervivencia de generación en generación, transmitiéndose de padres a hijos y así sucesivamente. Existen tres tipos de enfermedades genéticas: debidas a alteraciones en el número o estructura de los cromosomas (enfermedad cromosómica), a la alteración de varios genes (enfermedad poligénica) o a la alteración de un único gen (enfermedad monogénica).

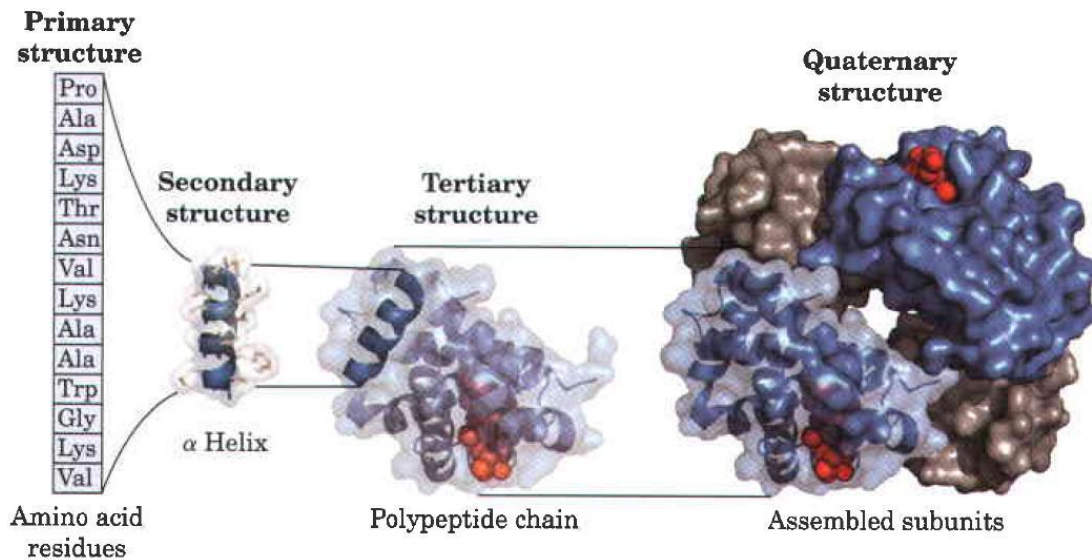
Son enfermedades hereditarias monogénicas las causadas por la mutación o alteración en la secuencia de ADN de un solo gen y se transmiten a la descendencia según las leyes de Mendel. Se conocen más de 6.000 enfermedades hereditarias monogénicas, con una prevalencia de un caso por cada 200 nacimientos.

Un grupo numeroso y heterogéneo de enfermedades hereditarias monogénicas está constituido por las hemoglobinopatías estructurales y las talasemias. El término talasemia, aunque no se utilizó por primera vez hasta el siglo XX, procede del griego (thalassa y haima) que significa mar y sangre. Este vocablo no podía ser más acertado puesto que hace referencia a una enfermedad de la sangre y que se circunscribe a poblaciones próximas al Mar Mediterráneo y al Mar Negro.

### III.1. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina es una molécula casi esférica con un diámetro de cerca de 5,5nm. Es una proteína tetramérica con 4 grupos prostéticos hemo, uno asociado con cada cadena polipeptídica. La hemoglobina adulta (Hb A) contiene 2 tipos de globinas, 2 cadenas  $\alpha$  (constituidas por 141 residuos cada una) y 2 cadenas  $\beta$  (146 residuos cada una) con dos ejes de simetría. En un término más amplio, la hemoglobina es un tetramero de 2 homodímeros (2 cadenas  $\alpha$  de globina y 2 cadenas  $\beta$ ) [1].

La estructura de la hemoglobina presenta varios niveles de complejidad. La estructura primaria está formada por la secuencia de aminoácidos ensamblada mediante uniones covalentes (enlaces peptídicos y puentes disulfuro). Por otro lado, la estructura secundaria hace referencia a la disposición de los aminoácidos en patrones estructurales típicos como la hélice  $\alpha$  o la lámina  $\beta$  que son particularmente estables. La estructura terciaria se define como el plegamiento de la estructura secundaria para dar lugar a una estructura globular o subunidad proteica. Finalmente, la estructura cuaternaria está constituida por la asociación de las diferentes subunidades de la proteína (Figura 1) [1].



**Figura 1: De la estructura primaria de la hemoglobina a la cuaternaria.**

Extraída de: Lehninger. Principles of biochemistry. 5ª Edición. Nelson DL, Cox MM. W.H. Freeman and company (2008), p 92. La estructura primaria constituida por la secuencia de aminoácidos, la secundaria generada por la disposición en  $\alpha$ -hélice de los aminoácidos. Estructura terciaria originada por plegamiento de la cadena peptídica y la cuaternaria producida por la unión de las 4 globinas para formar la molécula de hemoglobina.

Dos tercios de los aminoácidos se disponen de forma helicoidal, confiriendo rigidez a la estructura, que se estabiliza por puentes de hidrógeno, la cual adopta en el espacio una forma típica debido a varios plegamientos. La función principal de cada subunidad consiste en proporcionar un ambiente estable para el grupo hemo, en el cual pueda producirse la reacción reversible de oxigenación [2].

Este papel lo desempeña la estructura terciaria de cada subunidad, que está compuesta por 8 segmentos helicoidales, replegados sobre sí mismos, formando una estructura globular compacta en el centro de la cual está situado el grupo hemo, dentro de un bolsillo hidrofóbico, que mantiene el hierro en estado ferroso. Este bolsillo de unión al hemo está conformado por la hélices E y F de cada subunidad proteica [1-3].

Estas hélices no se distribuyen al azar, sino que se encuentran orientadas siguiendo unas reglas estándar de empaquetamiento de hélices, con el objetivo de

## INTRODUCCIÓN

formar una estructura globular [4]. Los residuos de aminoácidos situados hacia el interior de la molécula son apolares (alanina, valina, leucina, etc), mientras que los situados en la superficie en contacto con el medio acuoso exterior tienen cadenas laterales hidrófilas (lisina, glutamina). La exclusión de los residuos hidrófobos del medio acuoso mantiene fija la estructura globular. Finalmente, la hemoglobina tiene una estructura cuaternaria, resultado de la relación entre las cuatro cadenas polipeptídicas [1].

La estructura cuaternaria de la hemoglobina mantiene unas fuertes interacciones entre subunidades desiguales. Las interfases  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_2$  involucran a más de 30 residuos cada una, mientras que en las interfases  $\alpha_1\beta_2$  y  $\alpha_2\beta_1$  participan 19 aminoácidos. Las interacciones hidrofóbicas son las que predominan en todas las interfases pero también hay algunos puentes de hidrógeno y pocas uniones iónicas o puentes salinos [1].

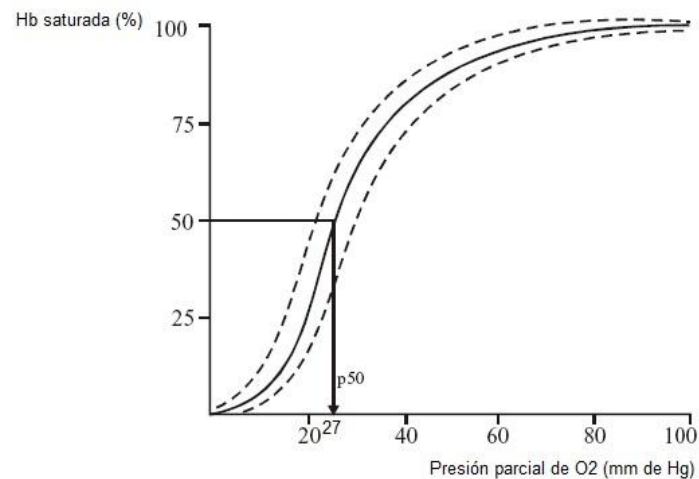
### III.2 FUNCIÓN DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina se localiza en el interior de los hematíes, siendo su función principal la de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, lo que se consigue gracias a la unión de la globina con el hemo, el cual se hace soluble, asegurándose un ambiente hidrófobo para captar de forma reversible el oxígeno. Para la realización de esta función es esencial el mantenimiento de la estructura y configuración espacial de la molécula de hemoglobina [2, 3].

La hemoglobina tiene dos formas cuaternarias distintas. La primera es la forma T (tensa) o desoxihemoglobina que es muy estable en ausencia de oxígeno a expensas de un gran número de pares iónicos en las interfases  $\alpha_1\beta_2$  y  $\alpha_2\beta_1$ . La segunda, es la forma R (relajada) u oxihemoglobina que se estabiliza gracias al oxígeno. Además el oxígeno al unirse a la hemoglobina induce el cambio de conformación de T a R, lo que

provoca la ruptura de parte de los pares iónicos que estabilizan la forma T y la creación de otros nuevos [1, 3].

La curva de disociación del oxígeno es sigmoidea debido a la cooperatividad que existe para unir las moléculas de oxígeno (Figura 2) [5], ya que estas favorecen un cambio conformacional (de la forma T a la forma R) en las subunidades restantes que facilita la unión de más moléculas de oxígeno en las otras subunidades. En consecuencia, la hemoglobina se comporta como una enzima alostérica [1].



**Figura 2: Curva de disociación de la hemoglobina.**

Se indica la forma de calcular la  $P_{50}$ . Cuando la afinidad por el oxígeno está aumentada, la curva de disociación de la hemoglobina está desplazada hacia la izquierda y por lo tanto, la  $P_{50}$  está disminuida. Por el contrario, se encuentran valores de  $P_{50}$  más altos en situaciones que impliquen una disminución de la afinidad por el oxígeno. En esos casos la curva de disociación de la hemoglobina está desplazada hacia la derecha.

Se define  $P_{50}$  como la presión parcial de  $O_2$  para la cual la hemoglobina se encuentra saturada al 50%. En condiciones fisiológicas la  $P_{50}$  es de 26,6 mmHg. La  $P_{50}$  se entiende como una medida inversa de la afinidad, es decir, a mayor afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, menor será el valor de la  $P_{50}$  y viceversa.

## INTRODUCCIÓN

Existen diversos factores fisiológicos que regulan la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno tales como el pH, la temperatura, la  $p\text{CO}_2$  (presión parcial de  $\text{CO}_2$ ) y la presencia de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

La influencia del pH se conoce como efecto Bohr y consiste en una disminución de la afinidad a pH ácido, lo que facilita la liberación de oxígeno en los tejidos donde el ión bicarbonato y el ácido láctico acidifican el medio. Lo mismo ocurre con el aumento de temperatura o de  $p\text{CO}_2$ .

La presencia de 2,3-DPG aumenta el valor de la  $P_{50}$ , es decir, disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este metabolito se sitúa entre las cadenas  $\beta$  y forma cuatro puentes salinos con aminoácidos polares de carga positiva que estabilizan la forma T pero no altera la capacidad alostérica de la hemoglobina. El 2,3-DPG se une a la hemoglobina en un lugar apartado del sitio de unión a oxígeno y por lo tanto, el 2,3-DPG ejerce una modulación alostérica heterotrópica [1].

Además existen otros factores exógenos y endógenos que pueden afectar a la  $P_{50}$ . Entre los que producen una disminución de la afinidad se encuentran el proceso de adaptación a la altitud, el hipertiroidismo, la obstrucción pulmonar grave y la anemia crónica. Todas estas situaciones generan un aumento del 2,3-DPG que es el responsable de la disminución de la afinidad. Asimismo existen hemoglobinas patológicas con la afinidad disminuida.

Por otro lado, los estados de shock o la sangre almacenada hacen que el 2,3-DPG disminuya y en consecuencia la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta. De igual manera, hay variantes de hemoglobina patológicas con la afinidad aumentada.

### III.3 TIPOS DE HEMOGLOBINAS

Existen 6 tipos de cadenas de globina en el ser humano, alfa ( $\alpha$ ), zeta ( $\zeta$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ). Las 2 primeras son las denominadas cadenas tipo  $\alpha$  y constan de 141 aminoácidos mientras que las restantes llamadas  $\beta$ -like o cadenas no  $\alpha$  son ligeramente más largas, constituidas por 146 aminoácidos. De las combinaciones dos a dos entre cadenas de globina tipo  $\alpha$  y no  $\alpha$  se van a formar las diferentes hemoglobinas, en los períodos embrionario, fetal, neonatal y adulto.

#### III.3.1 HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS

Hasta la fecha se han descrito cinco hemoglobinas (Hb) embrionarias diferentes: Hb Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower II ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), Hb Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) y Hb Portland II ( $\zeta_2\beta_2$ ) y III. Estas hemoglobinas se corresponden con las adaptaciones evolutivas y los cambios fisiológicos que se producen en el feto durante su desarrollo con objeto de realizar mejor su función principal, que es el transporte de oxígeno y  $\text{CO}_2$ . Todas ellas presentan una elevada afinidad por el oxígeno.

##### III.3.1.1 Hb Gower I

Es un tetrámero compuesto completamente de subunidades embrionarias,  $\zeta_2\epsilon_2$ . Corresponde al componente mayor de las hemoglobinas embrionarias. Las cadenas  $\epsilon$  son codificadas por un gen del *cluster*  $\beta$  situado por tanto en el cromosoma 11.

##### III.3.1.2 Hb Gower II

Es un tetrámero compuesto por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\epsilon$  ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), corresponde al componente menor de las hemoglobinas embrionarias.



### III.3.1.3 Hb Portland I

Es un tetrámero compuesto de dos cadenas  $\zeta$  y dos cadenas  $\gamma$ . La cadena  $\zeta$  muestra una fuerte homología estructural con la cadena  $\alpha$ . El gen que la codifica se encuentra situado en el lado 5' de los genes  $\alpha$ , en el cromosoma 16. La Hb Portland I tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la Hb A, menor cooperatividad entre subunidades que la Hb A y un efecto Bohr de aproximadamente la mitad que la Hb A.

## III.3.2 HEMOGLOBINAS DEL NEONATO Y DEL ADULTO

### III.3.2.1 Hemoglobina Fetal (Hb F)

Está constituida por 2 subunidades  $\alpha$  y 2  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). En el recién nacido representa entre el 60 y el 95% del total de la hemoglobina y desciende progresivamente durante los seis primeros meses tras el nacimiento, manteniéndose en niveles superiores al 1% en la mayoría de los casos hasta los dos años. En adultos, los valores normales se sitúan por debajo del 1%.

La cadena  $\gamma$  puede contener un residuo de Alanina (Ala) o Glicina (Gly) en la posición 136, denominándose  $\gamma^A$ ,  $\gamma^G$  respectivamente. En el neonato, el 75% es  $\gamma^G$  y el 25%  $\gamma^A$ , por el contrario, en el adulto el 40% de Hb F residual es a expensas de  $\gamma^G$  y el 60% de  $\gamma^A$ , teniendo lugar dicha transición en el primer año de vida.

La cadena  $\gamma^A$  puede tener en la posición 75 una Treonina (Thr) sustituyendo a una Isoleucina (Ile), se designa como  $\gamma^T$  y se conoce como Hb F Sardinia. Esta variante de Hb F se ha visto en el 30% de los recién nacidos blancos y en el 20% de los afroamericanos.

Desde el punto de vista funcional, la Hb F tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la Hb A como consecuencia de la incapacidad de la primera para unirse al

2,3-DPG, lo que le confiere una ventaja funcional en la captación de oxígeno a presiones bajas como sucede en el intercambio placentario [6].

La Hb F se encuentra aumentada en algunos trastornos hereditarios como en las  $\beta$ -talasemias, en la Persistencia Hereditaria de Hb F (PHHF) y anemia falciforme, y en otros adquiridos como la anemia megaloblástica, aplasia medular, algunas leucemias y ligeramente en un embarazo normal. Al contrario, los niveles de Hb F pueden estar disminuidos en recién nacidos con  $\alpha$ -talasemia puesto que las subunidades  $\alpha$  se combinan mejor con las  $\beta$  que con las  $\gamma$  [7].

### **III.3.2.2 Hemoglobina Bart (Hb B)**

Es un homotetrámero de cadenas  $\gamma$  ( $\gamma_4$ ) y se encuentra en cantidades menores al 2% en recién nacidos sanos. Posee una afinidad por el oxígeno aumentada, ausencia de la interacción hemo-hemo y efecto Bohr. Se encuentra ligeramente aumentada en los neonatos con  $\alpha$ -talasemia y funcionalmente es anómala.

### **III.3.2.3 Hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )**

Representa en el neonato menos del 0,5% del total de la hemoglobina mientras que en el adulto puede llegar al 3,5%. Su significación fisiológica se desconoce aunque probablemente tenga una función parecida a la Hb A [6]. Aumenta en las  $\beta$ -talasemias, en algunas variantes de la hemoglobina como la Hb S, en algunos casos de hipertiroidismo, anemia megaloblástica y en pacientes con HIV en tratamiento con antiretrovirales. En las  $\beta$ -talasemias se encuentra aumentada porque la cadena  $\delta$  y la  $\beta$  son muy similares y en ausencia parcial de la segunda, las cadenas  $\alpha$  tienen mayor afinidad por las cadenas  $\delta$ , mientras que en los portadores de Hb S es un falso aumento, debido a que la Hb S glicada coeluye junto con la Hb A<sub>2</sub> por HPLC [8].

La Hb A<sub>2</sub> disminuye en las  $\alpha$ -talasemias sobretodo en la enfermedad de la Hb H,  $\delta\beta$ -talasemias, cuando se coheredan una  $\delta$  y una  $\beta$ -talasemia, variantes estructurales de cadena  $\alpha$  y  $\delta$  de globina y por causas adquiridas como la anemia ferropénica, las anemias sideroblásticas y las eritroleucemias [9].

### III.3.2.4 Hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ )

Aproximadamente constituye el 97% del total de hemoglobina en el adulto, mientras que en el recién nacido tan solo representa entre un 20 y un 40%. Está formada por dos cadenas  $\alpha$  y otras dos  $\beta$  que se unen por cuatro grandes áreas de contacto: interfases  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_2$  y  $\alpha_2\beta_1$ .

Esta estructura se forma a partir de la unión de los aminoácidos mediante enlace peptídico, de modo que los grupos polares o hidrófilos (Lisina, Glutamina) se disponen en superficie, mientras que los apolares o hidrófobos (Alanina, Valina, Leucina) se disponen en el interior de la molécula, tapizando de esta forma la cavidad central y el bolsillo del hemo para así mantener su funcionalidad, efecto Bohr y poder tampón. Esta estructura ha de mantenerse con una cierta rigidez, que es lograda gracias a la disposición helicoidal de los aminoácidos, que se atraen entre ellos por una carga eléctrica débil.

### III.4 ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA Y ERITROPOYESIS

#### III.4.1 ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA

Las hemoglobinas que predominan en el embrión son las Hb Gower I, Hb Gower II y Hb Portland. Así, en los embriones más jóvenes examinados (5 semanas de gestación), la proporción de Hb Gower I y II son del 42% y del 24% respectivamente del total, siendo el resto Hb F. En etapas posteriores, la proporción de hemoglobinas Gower desciende hasta casi su total desaparición hacia la 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> semana de gestación.

El tiempo de aparición y desaparición de la Hb Portland ha sido más difícil de determinar, ya que su migración en gel de almidón es muy similar a la Hb A. En los fetos normales se puede observar a las diez semanas de gestación, mediante electroforesis de agar citrato, habiéndose cuantificado en un 20% del total de hemoglobina.

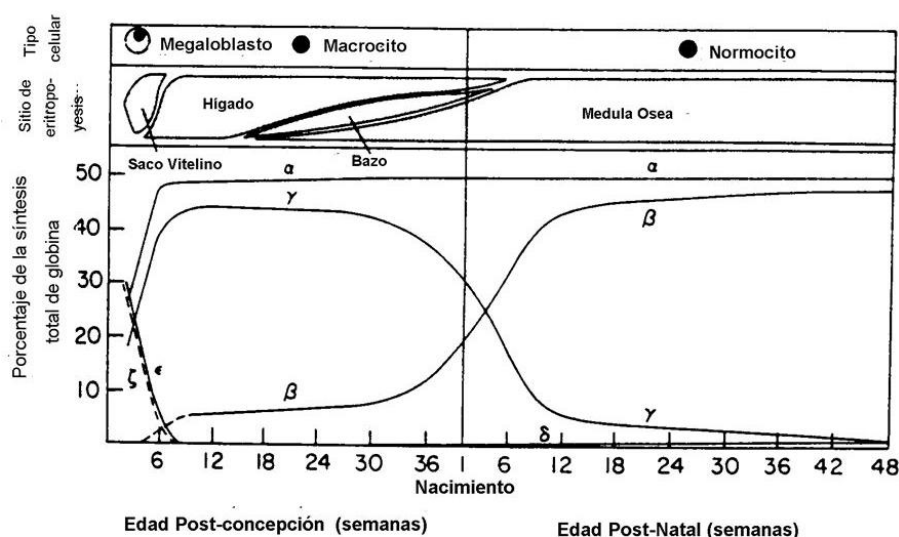
La Hb F aparece de manera precoz durante la gestación hacia la 8<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> semana constituyendo el 90% del total de la hemoglobina, permaneciendo así hasta poco antes del parto. Ambas cadenas  $\gamma^G$  y  $\gamma^A$  se sintetizan desde el principio del embarazo y su relación, de aproximadamente 3/1, permanece constante. A los seis meses de vida extrauterina la cantidad de Hb F es del 1% o menor, aunque puede encontrarse en niveles de 2% al 5% en niños normales, para al año situarse en los valores que se mantendrán durante toda la vida [6].

La Hb A, en cuantía del 5-10%, se detecta en fetos normales desde la 6<sup>a</sup> semana de gestación, aunque electroforéticamente no es demostrable hasta la 12<sup>a</sup> semana de vida. Pequeñas cantidades de cadena  $\beta$  pueden comprobarse por síntesis de globinas antes de la 6<sup>a</sup> semana, posteriormente se observa un ligero incremento en dicha síntesis

## INTRODUCCIÓN

(hacia la 12<sup>a</sup>-20<sup>a</sup> semana), sin embargo la proporción permanece constante hasta iniciarse la síntesis de la Hb A.

La última en aparecer es la Hb A<sub>2</sub>, que se comienza a producir en el tercer trimestre de la gestación, hacia la semana 35 de gestación, detectándose sólo cantidades traza en la sangre del cordón umbilical. Al nacimiento constituye el 0,5% y continúa ascendiendo hasta los seis meses de edad en que alcanza el valor definitivo en la etapa de adulto, entre el 2,5% y el 3,5% del total de la hemoglobina (Figura 3).



**Figura 3: Ontogenia de las cadenas de globina.**

Cambios en la síntesis de las distintas cadenas de globina a lo largo del desarrollo y su ubicación.

Por lo anteriormente señalado, se comprende cómo el déficit o anomalía de las cadenas  $\alpha$  se manifiesta mejor en el periodo neonatal. Después del parto la síntesis de cadena  $\beta$  va aumentando y, puesto que la apetencia de la cadena  $\alpha$  es mayor por la  $\beta$  que por la  $\gamma$ , es por lo que las cantidades de Hb Bart ( $\gamma_4$ ) se cuantifican mejor en el neonato que en el adulto. Además, como la cadena  $\alpha$  forma parte de las Hb Gower II, Hb F, Hb A y Hb A<sub>2</sub> la síntesis de cadena  $\alpha$  se va a manifestar en todas las etapas del desarrollo.

En cuanto a las variantes estructurales de cadena  $\alpha$  que pueden aparecer, van a tener el mismo porcentaje de hemoglobina anómala en el periodo neonatal que en el adulto, mientras que las de cadena  $\beta$  se van a manifestar más claramente durante el periodo de adulto. Las de cadena  $\gamma$  se detectan mejor en el periodo neonatal, debido a que desaparecen rápidamente en la vida adulta.

### **III.4.2 ERITROPOYESIS**

La hematopoyesis, es la formación de células sanguíneas que tiene que producirse de una forma continuada puesto que las células sanguíneas tienen una vida media relativamente corta y además el número de las mismas se mantiene constante a lo largo de la vida.

La diferenciación y maduración de la línea eritroide, supone una secuencia de acontecimientos que comienzan en la célula madre pluripotente, continúan en las células comprometidas a la línea eritroide y finalizan en la producción de eritrocitos maduros, los cuales sintetizarán exclusivamente la hemoglobina.

El proceso de formación de sangre comienza en el saco vitelino, alrededor de la 3ª o 4ª semana de gestación (fase mesoblástica) con la diferenciación de las células mesoblásticas en eritroblastos primitivos, que sintetizan las hemoglobinas embrionarias Gower I y II. Morfológicamente, estos eritroblastos primitivos recuerdan a las células eritroides megaloblásticas, aunque aparentemente no se desarrollan hasta eritrocitos maduros. La actividad hematopoyética en el saco vitelino es de corta duración, descendiendo hasta niveles indetectables a mediados del tercer mes.

La hematopoyesis hepática (fase hepato-esplénica) alcanza su máximo nivel hacia el tercer mes de gestación, coincidiendo con el declive de la fase mesoblástica, y

## INTRODUCCIÓN

permanece activa hasta el 7º mes de gestación que comienza un descenso gradual que dura hasta el nacimiento. En esta fase se producen todo tipo de células sanguíneas, incluyendo eritrocitos. Los eritroblastos hepáticos son normoblásticos y sintetizan predominantemente Hb F, pequeñas cantidades de Hb A y al principio del periodo cantidades traza de Hb Gower II y Hb Portland. El bazo también refuerza la cantidad hematopoyética durante este periodo, con una producción más activa de tejido linfoide.

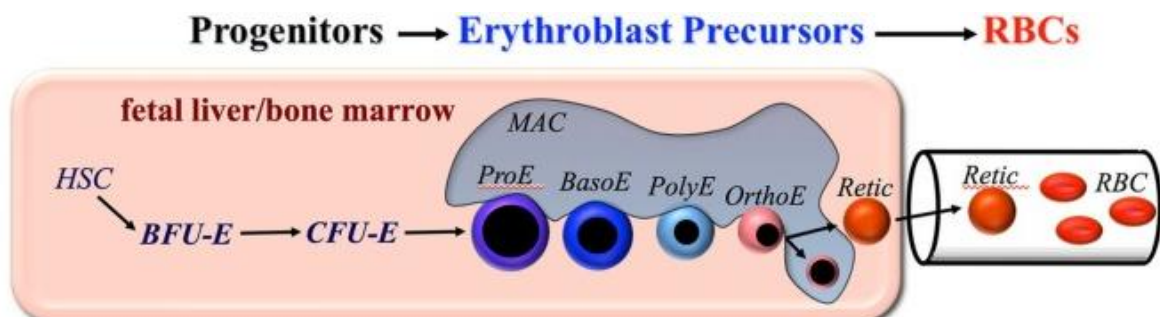
La médula ósea (fase medular) comienza a producir sangre al 5º mes de gestación, con un incremento progresivo y máximo en el momento del nacimiento. A partir de ese momento será el único lugar productor de células madre en condiciones basales, ya que el hígado y el bazo, aunque mantienen su potencial hematopoyético durante toda la vida, son inertes.

Los eritrocitos proceden de una población de células pluripotentes que se conocen como Unidad Formadora de Colonias en el Bazo (CFU-S), Célula *Stem* Hematopoyética (HCS), Célula *Stem* Pluripotente (PSC) o Célula *Stem* no Comprometida (USC). A partir de las mismas, gracias a la intervención de diversos factores humorales, como la interleukina 3, aparecen los precursores comprometidos con la línea eritroide denominados Unidad Formadora de Ramilletes (*Burst*) Eritroides (BFU-E) y Unidad Formadora de Colonias Eritroides (CFU-E). Estos progenitores se definen por su capacidad de formar colonias de células eritroides maduras en medios semisólidos. Las colonias derivadas de BFU-E requieren de entre 7 y 14 días en los sistemas de ratón y humanos, respectivamente, para formar colonias maduras y contienen típicamente más de un millar de células eritroides. Por el contrario, los progenitores más maduros, CFU-E, requieren sólo entre 2 y 7 días en sistemas de ratón

y humanos, respectivamente, para formar colonias maduras y que cuentan con tan sólo 16-32 células [10].

La eritropoyetina (EPO) es una citoquina necesaria para inducir la capacidad de CFU-E para generar colonias *in vitro*. Se cree que los niveles de EPO en el torrente sanguíneo, regulados por la hipoxia, modulan el número de CFU-E en la médula ósea y por lo tanto, regulan la salida de los glóbulos rojos definitivos a sangre periférica [10].

El primer precursor nucleado morfológicamente identificable es el proeritroblasto (ProE) que se divide para dar lugar a dos eritroblastos basófilos (BasoE). Por sucesivas divisiones dependientes de ácido fólico, vitamina B12, hierro y vitamina B6 se obtiene el eritroblasto policromatófilo (PolyE) y el eritroblasto ortocromático (OrthoE) (Figura 4). La maduración progresiva del precursor eritroide se caracteriza por la expansión de eritroblastos a través de un conjunto limitado de divisiones celulares simétricas, la acumulación de la hemoglobina, disminución del tamaño celular, picnosis nuclear, y disminución en el contenido de ARN. Los criterios morfológicos distintivos de estas células se ha basado principalmente en la condensación nuclear gradual combinada con cambios en la tinción citoplásmica, que refleja el grado de hemoglobina y el contenido de ARN [10].



**Figura 4: Eritropoyesis en el adulto.**

Modificada de: Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol.* 2014; 5:3.



## INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, el resultado final de la maduración de los precursores es la enucleación, lo que origina la formación de dos tipos de células. La primera población se compone de reticulocitos que contienen la mayor parte del citoplasma y la hemoglobina, así como las proteínas necesarias para formar el citoesqueleto. La segunda población se compone de pirenocitos o núcleos extruidos, que contienen el núcleo condensado rodeado por una bicapa lipídica y un borde delgado de citoplasma [10].

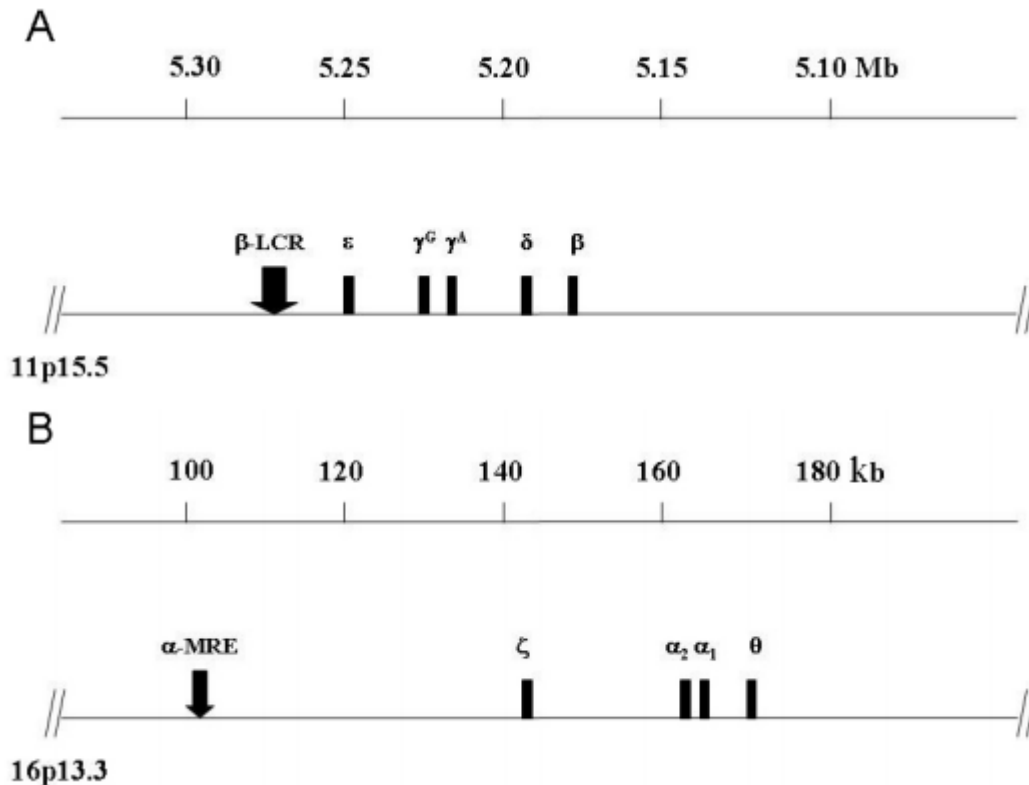
La maduración de reticulocitos es un proceso complejo que se traduce en una pérdida de aproximadamente el 20% del área de superficie de la membrana, reducción del volumen celular, aumento de la asociación citoesqueleto-membrana plasmática, y la pérdida de todos los orgánulos citoplasmáticos residuales, incluyendo las mitocondrias y ribosomas. Los cambios de membrana convierten a la célula en un disco bicóncavo con una mejor viscoelasticidad. Todos estos cambios preparan al eritrocito maduro para su estancia de 120 días en el torrente sanguíneo [10].

El número de glóbulos rojos en circulación se mantiene constante, en condiciones normales, gracias a la producción y liberación continua de reticulocitos en el torrente sanguíneo para equilibrar la eliminación de hematíes senescentes por los macrófagos, que se localizan principalmente en el bazo [10].

### III.5 ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GENES GLOBÍNICOS

Los genes encargados de la síntesis de las cadenas de globina se encuentran localizados de forma agrupada en bloques multigénicos o *clusters*. El *cluster*  $\beta$ , que agrupa los genes  $\beta$ -like o genes no  $\alpha$ , se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5). El *cluster*  $\alpha$  se localiza en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) [11]. En ambas agrupaciones se ubica en primer lugar un

elemento regulador (LCR o HS-40 respectivamente) y los genes ordenados con la secuencia ontogénica de su expresión, en dirección 5'→3', (primero los genes embrionarios ( $\zeta$ ,  $\epsilon$ ), seguidos de los genes fetales ( $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ) y por último los adultos ( $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ ,  $\beta$ )). En el *cluster*  $\beta$  la secuencia de genes es:  $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  y  $\beta$ . Por lo que respecta al *cluster*  $\alpha$ , el orden es:  $\zeta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  y  $\theta$  (Figura 5).



**Figura 5: Localización y ordenamientos de los *cluster*  $\beta$  (A) y  $\alpha$  (B).**

Extraída de: Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. Genet Mol Res. 2008; 7(4):1045-53. Los genes están representados por cajas negras y los elementos reguladores por flechas negras.  $\beta$ -LCR = Región Locus Control- $\beta$ ;  $\alpha$ -MRE = Elemento Regulador Principal- $\alpha$  (HS-40).

La gran cantidad de información acumulada sobre la estructura de las globinas en diferentes animales, ha permitido conocer la evolución molecular de la hemoglobina. En base a estos datos se ha calculado que el proceso evolutivo de las especies de los genes  $\alpha$  y  $\beta$  ancestrales comenzaron a divergir hace aproximadamente 500 millones de años en un estadio muy temprano de la evolución de los vertebrados. Posteriormente

cada bloque ha continuado evolucionando independientemente, a través de diferentes procesos genéticos, como son las duplicaciones seguidas de diferentes tipos de mutaciones [12].

### III.5.1 ORGANIZACIÓN DEL CLUSTER $\alpha$ GLOBINA

El *cluster*  $\alpha$  se expande a lo largo de aproximadamente 80Kb incluyendo siete genes dispuestos en tándem y organizados en el orden telómero (5')- $\zeta$ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta$ -centromero (3'), donde  $\psi$  se utiliza para denominar los pseudogenes [13].

Existe un control de la transcripción de estos genes, resultando en cambios de su expresión regulados por el desarrollo. El gen  $\zeta$  se expresa en el estado embrionario,  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  en los estadios fetal y adulto y el gen  $\theta$  también en adultos aunque solamente en los primates más desarrollados, mientras que en otras especies es un pseudogen. Los niveles de expresión de este último gen son muy bajos y su función permanece desconocida [13].

En el *cluster*  $\alpha$  los genes se encuentran separados entre sí por una cantidad variable de pares de bases denominadas distancias intergénicas. Los genes que evolutivamente son más antiguos como  $\zeta$  se encuentran a mayor distancia intergénica que los que han aparecido en una duplicación relativamente reciente como son  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ .

Los pseudogenes son estructuras genéticas con alta homología a los auténticos genes, pero no corresponden a cadenas polipeptídicas conocidas. En ellos se han encontrado anomalías estructurales que pueden impedir su expresión normal. Se especula, que su aparición se deba a fenómenos de duplicación genética, seguidos de mutaciones que les confieran alteraciones que impiden su correcta expresión.

El único gen embrionario del *cluster*  $\alpha$ , es  $\zeta$ , el cual se encuentra aproximadamente a 8Kb del pseudogen  $\psi\zeta$ .

Los pseudogenes ( $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_2$  y  $\psi\alpha_1$ ) se disponen muy próximos entre sí; la distancia intergénica es de cerca de 1Kb entre  $\psi\zeta$  y  $\psi\alpha_2$  y de algo más de 1Kb entre  $\psi\alpha_2$  y  $\psi\alpha_1$ . El último pseudogen se encuentra ubicado aproximadamente 3Kb *upstream* del gen  $\alpha_2$ , y este a su vez a una distancia similar del gen  $\alpha_1$ . Esta distancia intergénica se repite con el gen  $\theta$ .

Los genes  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  tienen una enorme similitud entre ellos. El péptido resultante a partir de ambos genes es idéntico ya que las regiones codificantes (exones) de los dos son equivalentes, sin embargo, el gen  $\alpha_2$  tiene unos niveles mayores de expresión que el gen  $\alpha_1$  (el 75% de la cadena  $\alpha$  de globina procede del gen  $\alpha_2$ ), probablemente debido a su mayor cercanía con el  $\alpha$ -MRE. Cada uno de los genes  $\alpha$  ( $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ ) se encuentra dividido en tres subsegmentos homólogos (X, Y, Z), separados por tres segmentos no homólogos (I, II, III). Las únicas diferencias entre ambos genes residen en la segunda región transcrita pero no traducida (intrón) y en la región no traducida de 3' (3'UTR).

De hecho, su enorme homología permite que se produzcan entrecruzamientos desiguales (*crossing-over*). Esta recombinación conlleva a la formación de genes híbridos  $\alpha_2\alpha_1$ , originando cromosomas con un único gen  $\alpha$  ( $-\alpha^{3,7}$ ) y el correspondiente con la triplicación que contiene el gen fusionado recíproco  $\alpha_1\alpha_2$  (anti  $\alpha^{3,7}$ ), además de los genes  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  normales.

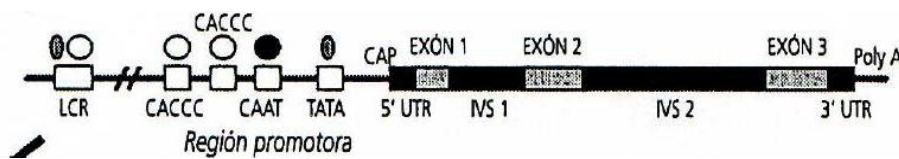
A lo largo del ADN eritroide existen 7 zonas hipervariables, siendo un rasgo característico que contenga algunos segmentos de ADN llamados microsatélites. Fueron identificados como regiones polimórficas hipervariables y situadas en el C3' terminal

del complejo de globina  $\alpha$ . Todas las regiones hipervariables son polimórficas, tanto en individuos normales como en personas que padezcan  $\alpha$  talasemia, por esta razón es de gran importancia el análisis genético del *cluster*  $\alpha$  de globina.

### III.5.2 ESTRUCTURA DE LOS GENES $\alpha$ DE GLOBINA

Un gen es un segmento de ADN que contiene las secuencias de nucleótidos que controlan la síntesis de una cadena polipeptídica y determinan tanto su composición aminoacídica como su expresión cuantitativa.

Los genes  $\alpha$  de globina se componen de 3 dominios fundamentales: El gen estructural, la región promotora que se encuentra a la izquierda (5'UTR) y la región de poliadenilación que se sitúa a la derecha (3'UTR). También encontramos las secuencias reguladoras de control (Figura 6) [6].



**Figura 6: Estructura de un gen de globina.**

Modificada de: González F, Ropero P. Capítulo 14: Síndrome talasémico. Madero L, Lassaletta Á, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª ed. Ergon. 2015. Majadahonda (Madrid). p. 153.

#### III.5.2.1 Secuencias reguladoras

Los genes de globina son regulados de manera específica por tejido y estado de desarrollo para producir diferentes hemoglobinas. Este complejo patrón de expresión de 2 loci físicamente separados depende de secuencias que actúan en cis, tales como la región promotora, y secuencias que actúan en cis pero a cierta distancia como es el caso de  $\alpha$ -MRE en el *cluster*  $\alpha$  [11].

El  $\alpha$ -MRE se compone de 4 sitios hipersensitivos para DNasa I, específicos eritroides, localizados a 10 (HS-10), 33 (HS-33), 40 (HS-40) y 48 Kb (HS-48) “corriente arriba” del CAP del ARNm del gen  $\zeta$  de globina. Se conoce que solamente el HS-40 tiene un significativo efecto en la expresión de los genes  $\alpha$  [11]. HS-40 se sitúa en el intrón del gen de expresión constitutiva C16orf35. La presencia de un exón entre HS-40 y los genes  $\alpha$  da como resultado una estructura única de organización génica y podría cambiar la dinámica de las interacciones entre este elemento regulador y los genes estructurales localizados “corriente abajo” [13]. Además, el locus de  $\alpha$  globina se encuentra ubicado en un entorno de cromatina constitutivamente abierta.

El elemento regulador se comporta como un potenciador clásico, cuya función principal es activar y potenciar la expresión del gen  $\zeta$  de globina y de los promotores de los genes  $\alpha$  [11]. De hecho se ha observado que, en ausencia del HS-40, los genes  $\alpha$  no pueden expresarse, hecho que ha sido demostrado tanto en modelos murinos transgénicos como en patología humana [6].

El dominio funcional de este elemento está restringido a un fragmento central de 350pb en el cual existen varios sitios de unión a proteínas bien conservados. Esto incluye cuatro sitios de unión potenciales para el factor específico eritroide GATA-1, cuatro cajas CACC y dos sitios de unión para el factor eritroide NF-E2 [6, 11, 14].

El  $\alpha$ -MRE es genéticamente polimórfico y se han encontrado 6 haplotipos diferentes. En la mayoría de estos polimorfismos no se espera que exista interferencia con la regulación de la expresión de los genes  $\alpha$ , puesto que se encuentran entre sitios para factores nucleares o en sitios considerados inactivos *in vivo*, excepto para el haplotipo D, en el cual una sustitución en la posición 158 cambia el primer sitio consenso de unión al factor NF-E2 [11].

### III.5.2.2 Región promotora

La región que precede al gen estructural, denominada promotora, está constituida por las secuencias nucleotídicas esenciales para la iniciación exacta y eficiente de la transcripción. Es el lugar donde se fija la ARN polimerasa II para iniciar esta etapa.

Esta región comprende los 148 nucleótidos inmediatamente a la izquierda del gen. El sitio CAP es la zona situada inmediatamente delante del codón de iniciación y que se transcribe al ARNm. En los genes  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  se localiza entre el nt -1 y el +2 y tiene la secuencia CAC [15].

A -29pb del sitio CAP se encuentra la secuencia CATAAA que recibe el nombre de caja TATA y es la encargada de iniciar la transcripción ya que contribuye a colocar la ARN polimerasa en su sitio correcto [16]. El segundo sitio conservado se encuentra a -71pb del CAP y está formado por la secuencia CCAAT, se denomina caja CAAT y determina el nivel de la transcripción. Finalmente, el tercer bloque es algo más variable y se encuentra situado a -100pb del CAP, siendo su secuencia GGGGGCG y pudiendo aparecer por duplicado en algunos genes [6].

### III.5.2.3 Gen estructural

El prototipo de gen estructural de las globinas contiene tres secuencias codificadoras o exones separadas por dos secuencias transcritas pero no traducidas o intrones [*Intervening sequence* (IVS)].

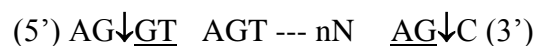
El primer exón contiene el codon de iniciación que codifica la metionina inicial y que en el caso de los genes  $\alpha$  será eliminada posteriormente durante el procesamiento postraducional de la cadena proteica. Además, está constituido por los codones del 1 al

30 y los 2 primeros nucleótidos del codon 31. Estos aminoácidos se corresponden con las hélices A y B de la  $\alpha$ -globina [6].

El segundo exón comienza en el tercer nucleótido del triplete 31 y se extiende hasta el codon 99. Esta zona va desde el final de la hélice B hasta el principio de la hélice G y codifica la región de unión del grupo hemo y los contactos  $\alpha_1\beta_2$  [6].

Finalmente, el tercer exón abarca desde el codón 100 hasta el 141 y por último, el codon de *stop*. Estos aminoácidos completan las dos últimas hélices de la cadena  $\alpha$  de globina e incluyen los contactos  $\alpha_1\beta_1$  [6].

Por otro lado, los intrones (IVS) son posteriormente eliminados en un proceso de corte y empalme o *splicing* y por tanto, no originan cadena proteica. Para que el *splicing* se realice de manera adecuada existen secuencias consenso en el borde de los intrones que delimitan y determinan la zona que debe ser eliminada durante el procesamiento postranscripcional del ARNm. El dinucleótido donador (se encuentra en 5' del intrón) es GT y el aceptor (3' del intrón) es AG. Generalmente se representa:



donde N representa cualquier nucleótido y n un número igual o mayor a 11. Las flechas indican los sitios dentro de la secuencia consenso donde ocurre el *splicing*.

La importancia de estas secuencias se demuestra por el hecho de que mutaciones que alteran las secuencias de consenso normales, o que crean otras parecidas, modifican el procesamiento normal del ARNm y constituyen la base molecular de muchos tipos de talasemias [6].



## INTRODUCCIÓN

En los genes  $\alpha$ , el IVS-1 posee 117pb y separa el primer exón del segundo, mientras que el IVS-2 tiene 142pb en  $\alpha_2$  y 149pb en  $\alpha_1$ , ya que es en este punto donde se encuentran casi en exclusiva las diferencias entre ambos genes.

A pesar de existir gran especulación sobre el significado de los intrones, su función no ha sido dilucidada. Existe la hipótesis de que los intrones separan regiones de los genes que codifican dominios funcionales diferentes en una proteína. En el caso de las globinas, el exon central codifica los aminoácidos en contacto con el grupo hemo y también la mayoría de los que constituyen los contactos  $\alpha_1\beta_2$ , mientras que los residuos que forman los contactos  $\alpha_1\beta_1$  están codificados por el tercer exón, por lo que los intrones realmente separan regiones codificadoras bien definidas en la estructura terciaria de la cadena peptídica [6].

### III.5.2.4 Región de Poliadenilación

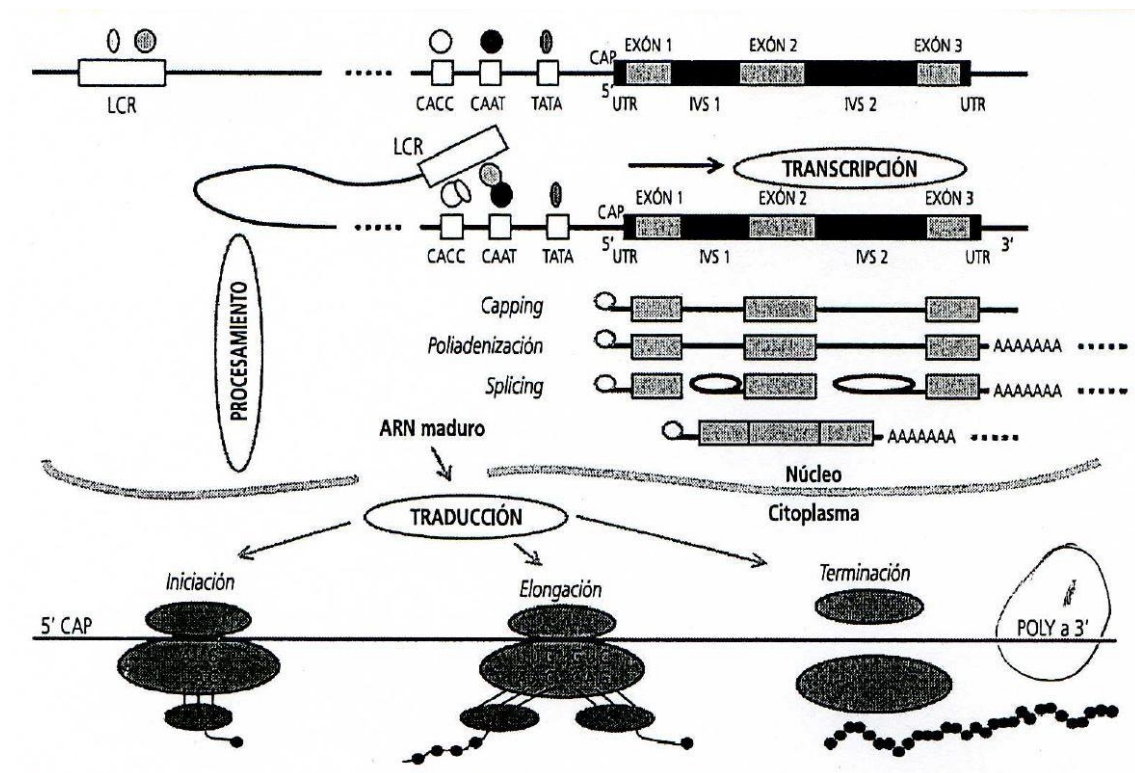
Es la región inmediatamente situada en el extremo 3' del gen estructural, se transcribe al ARNm y contiene secuencias importantes para el procesamiento del extremo 3' del mismo y para la adición del ácido poliadenílico (Poly A), proceso que recibe el nombre de poliadenilación. El Poly A es considerado esencial para el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma y para su estabilidad [6].

El extremo 3' de las secuencias no codificadoras de los genes de las globinas que se transcribe, constituye la región de mayor variación en la estructura de los mismos, con excepción de la secuencia AATAAA situada a unas 20pb del lugar donde tiene lugar la escisión del ARNm y la posterior poliadenilación [6]. En el caso de los genes  $\alpha$ , en dicho extremo 3' es donde se localizan las restantes diferencias entre ambos genes, siendo el lugar más variable entre el gen  $\alpha_2$  y el  $\alpha_1$ .

Se ha demostrado que sustituciones de bases en la secuencia invariable del Poly A son responsables de ciertos tipos de talasemias debidas a una alteración en el procesamiento y poliadenilación del ARNm de la globina.

### III.6 EXPRESIÓN DE LOS GENES $\alpha$ DE GLOBINA

El proceso de expresión de genes consiste en la síntesis de proteínas a partir de las “instrucciones” escritas en el ADN y para llevarse a cabo es necesario que tenga lugar la **Transcripción**, **Procesamiento del pre-ARNm** y **Traducción**. Las 2 primeras etapas tienen lugar en el núcleo y la última en el citoplasma (Figura 7).



**Figura 7: Etapas de la expresión de los genes de globina.**

Modificada de: González F, Ropero P. Capítulo 14: Síndrome talasémico. Madero L, Lassaletta Á, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª ed. Ergon. 2015. Majadahonda (Madrid). p. 154.

La expresión de los genes  $\alpha$  es desigual, ya que a partir del gen  $\alpha_2$  se obtiene mayor cantidad de ARNm que a partir del gen  $\alpha_1$ . El gen  $\alpha_2$  controla tres cuartas partes de la síntesis de cadenas  $\alpha$  de globina totales, lo que probablemente sea debido a la

mayor proximidad de los promotores del primero con respecto al  $\alpha$ -MRE que los del segundo [17, 18].

### III.6.1 TRANSCRIPCIÓN

Hoy en día se sabe que, el ADN no sirve de molde directo para ordenar los aminoácidos en las proteínas, sino que por el proceso de transcripción, pasa la información desde el ADN en el núcleo hasta el citoplasma de la célula a través del ARNm.

La regulación molecular de la transcripción es llevada a cabo a través de complejas interacciones entre factores generales de la transcripción y específicos del eritrocito con las secuencias presentes en el  $\alpha$ -MRE y en la región promotora del gen  $\alpha$ .

Los factores específicos de la transcripción son proteínas nucleares con dos dominios bien diferenciados, uno se une a una secuencia específica del ADN, mientras que el otro coopera con otros factores de la transcripción para determinar la cantidad de ARN que debe ser transcrita.

El locus de  $\alpha$  globina contiene sitios de unión para GATA-1 y EKLF en los elementos de regulación situados “corriente arriba” así como en los promotores de los genes  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ . Los experimentos de captura de la conformación cromosómica han demostrado recientemente que  $\alpha$ -MRE y el promotor de  $\alpha_2$  se encuentran físicamente muy próximos en las células eritroides, a pesar de las aproximadamente 40Kb de secuencia que los separan. Esto es debido a que este ADN forma un bucle de manera análoga a lo que ocurre con el LCR y el promotor de  $\beta$  [12].

GATA-1 es una fosfoproteína expresada sólo en las células eritroides, megacariocíticas y cebadas y se une a uno o más de los promotores y elementos

reguladores de todos los genes específicos de la línea eritroide, incluyendo el promotor para la propia GATA-1. Estudios en células madre de ratas embrionarias han establecido que GATA es fundamental para el desarrollo tanto del eritroblasto primario como del definitivo. GATA-1 puede actuar como un activador tisular específico de la transcripción, probablemente a través de interacciones con componentes de la maquinaria de transcripción basal.

Un segundo factor, NF-E2, está también expresado en células eritroides, megacariocitos y células cebadas. Se han identificado sitios de enlace funcionales a NF-E2 en los *clusters* de globina de muchas especies y especialmente dentro de la zona del HS-40 del agrupamiento  $\alpha$  de globina. Parece ser, que es necesaria esta interacción para que se inicie el proceso de transcripción.

Se desconoce cómo los factores que modifican la cromatina son reclutados al locus de globina  $\alpha$  para mediar en la acetilación de histonas, remodelamiento de los nucleosomas y formación del bucle de la cromatina. Este bucle permite que la ARN polimerasa II sea transferida desde los elementos de regulación corriente arriba hasta el promotor y así facilitar la transcripción. Este mecanismo es una parte esencial de la activación de la transcripción [12].

De esta manera, la transcripción a un pre-ARNm está dirigida por la ARN polimerasa II y es iniciada en el sitio CAP, continúa a través de los exones e intrones hasta más allá del sitio de adición del Poly A. La caja TATA fija la iniciación de la transcripción a unas 30 pb “corriente abajo” mientras que la caja CAAT determina el nivel de la transcripción.

### III.6.2 PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNm

Se denomina procesamiento del pre-ARNm a una serie de modificaciones que tienen lugar en ambos extremos del mismo.

En el extremo 5' tiene lugar el llamado *capping* que consiste en la adición del CAP (7-metil-guanosina) al nucleótido 1 del ARNm. Esta estructura contribuye al aumento en la eficacia de la traducción y estabilidad del ARNm. En el extremo 3' tiene lugar la escisión del ARNm por la secuencia AAUAAA seguida de la adición, en ese mismo punto, de la cola de Poly A de aproximadamente unas 200pb que aumentan la estabilidad del ARNm.

La última modificación que sufre el ARNm antes de salir del núcleo es el *splicing* (empalme), durante el cual los intrones son eliminados y los exones se unen para formar un ARNm maduro. El proceso comienza con la escisión del extremo 5' del intrón (extremo donador) y la formación de un rizo hacia el interior del intrón, uniéndose covalentemente a un residuo de adenina del extremo 3' (extremo aceptor) formándose una estructura conocida como “lariat” o lazo.

### III.6.3 TRADUCCIÓN

Se conoce así al conjunto de procesos que tienen lugar en el citoplasma del eritroblasto, mediante los cuales el ARNm dirige la síntesis de la proteína. El ARNm será el molde sobre el que los residuos de aminoácidos se unirán unos a otros de forma ininterrumpida en dirección  $5' \rightarrow 3'$ , siendo necesaria la intervención del ARN de transferencia (ARNt), el encargado de transportar los aminoácidos hasta los ribosomas, en donde tendrá lugar la síntesis proteica. Esta etapa de la traducción es conocida como elongación.

Cada aminoácido viene definido por un codón o triplete de bases. El punto de inicio de la traducción, es un triplete de bases universales, AUG, que codifica el aminoácido metionina y que en el caso de los genes  $\alpha$ , será posteriormente retirado durante las modificaciones postraduccionales.

La finalización de la traducción es llevada a cabo por los codones de terminación o sin sentido (UAA/UGA/UAG), separándose el polipéptido del ARNt por acción de una hidrolasa y disgregándose las dos subunidades del ribosoma.

### III.7 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLOBINA

Todos los procesos anteriormente descritos son muy complejos y están sometidos a una serie de mecanismos de regulación que hacen posible:

1. Expresión selectiva de los genes de globina en las células hematopoyéticas y la supresión en las no eritroides.
2. Mantener en equilibrio la cantidad de globina producida por los genes  $\alpha$ -*like* y  $\beta$ -*like*, así como la síntesis de ambos tipos de cadenas en los momentos y cantidades requeridas.
3. Acoplamiento de la síntesis de globina y la del grupo hemo.

La expresión selectiva de los genes de globina en el tejido hematopoyético parece estar regulada por las proteínas GATA-1 y NF-E2 que forman parte de una cadena de factores que lleva a las células *stem* pluripotentes a la diferenciación en eritrocitos, mediante la activación de un subconjunto de genes cuya expresión es característica de los hematíes. A pesar de las investigaciones, los mecanismos por los

## INTRODUCCIÓN

cuales se lleva a cabo el control de la regulación son poco claros y aún no están bien definidos.

Por otro lado, se sabe que el equilibrio entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  está regulado por los niveles de ARNm producidos durante la transcripción, habiéndose observado, que la cantidad de ARNm  $\alpha$  es dos veces superior al ARNm  $\beta$  debido a un nivel transcripcional de los dos genes diferente.

Por último, la regulación de la síntesis de hemoglobina a nivel de traducción se realiza fundamentalmente por la inhibición de la iniciación de la traducción en ausencia del grupo hemo, mediante la activación de un factor de iniciación (eIF-2), acoplándose de esta forma la síntesis de globina y la del grupo prostético.

### III.8 ENSAMBLAJE DE LAS UNIDADES DE GLOBINA

El concepto de chaperona molecular, como proteína que puede interaccionar con otras proteínas y ayudarlas a alcanzar su conformación activa final, fue establecido en 1987. Estas chaperonas participan en una gran variedad de procesos fisiológicos relacionados con la corrección de la estructura de las proteínas durante su síntesis y después y tras su liberación de los ribosomas. Hasta la actualidad han sido descritas más de 25 familias de proteínas que actúan como chaperonas [19].

La Proteína Estabilizadora de las cadenas Alfa de la Hemoglobina o AHSP por sus siglas en inglés, es una chaperona de pequeño tamaño que se une específicamente a las cadenas  $\alpha$  de globina libres. Su función principal es regular la estabilidad, plegamiento y ensamblaje de la subunidad  $\alpha$  de la hemoglobina [19, 20].

### III.8.1 AHSP: ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN GÉNICA

El gen *AHSP* se localiza en el cromosoma 16 y está formado por 3 secuencias codificantes o exónicas y 2 secuencias intrónicas no codificantes. Comprende aproximadamente 1,8Kb, da lugar a un péptido de 102 aminoácidos con un peso molecular de 12KDa y es una proteína altamente conservada [19, 20].

La expresión génica de *AHSP* está controlada por GATA-1, un factor de transcripción que es esencial para la supervivencia y maduración de los precursores eritroides. También participan de este control de expresión los factores Oct-1 y EKLF que tienen un papel crucial en la eritropoyesis [19, 20].

Se han identificado varios Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) en el gen *AHSP*, uno de los cuales se encuentra en el intrón 1 y altera el sitio de unión para Oct-1, lo cual reduce la expresión de AHSP. Además, la expresión génica de AHSP se puede ver afectada por los niveles de hierro ya que posee Elementos de Respuesta a Hierro (IRE) que pueden interaccionar con Proteínas Reguladoras de Hierro (IRP). Este hecho sugiere que la expresión de *AHSP* puede verse disminuida en situaciones de exceso de hierro y aumentada ante deficiencias del mismo [19].

### III.8.2 AHSP: ESTRUCTURA PROTEICA Y MECANISMO DE ACCIÓN

La AHSP está compuesta por un conjunto de 3  $\alpha$ -hélices alargadas y antiparalelas. Tiene actividad chaperona independiente de ATP, no forma complejos oligoméricos y es tejido y sustrato específica. Juega un papel muy importante en la eritropoyesis y podría ser un modulador de condiciones patológicas tales como las talasemias [19].



AHSP forma un heterodímero con la cadena  $\alpha$  de la hemoglobina a nivel de la zona que participa en la interfase  $\alpha_1\beta_1$  en la hemoglobina, es decir, por la misma interfase que la subunidad  $\beta$  de globina [20]. Los contactos intermoleculares entre  $\alpha$  y AHSP son menores que entre  $\alpha$  y  $\beta$  y esto podría explicar porque AHSP es reemplazada por  $\beta$ . AHSP es capaz de unirse a la cadena  $\alpha$  de globina en ausencia o en presencia del grupo hemo indistintamente e incluso independientemente de que el hierro del grupo hemo se encuentre en forma ferrosa o férrica. La chaperona por tanto, promueve el correcto plegamiento de la cadena  $\alpha$  y la confiere protección frente a la proteólisis [19].

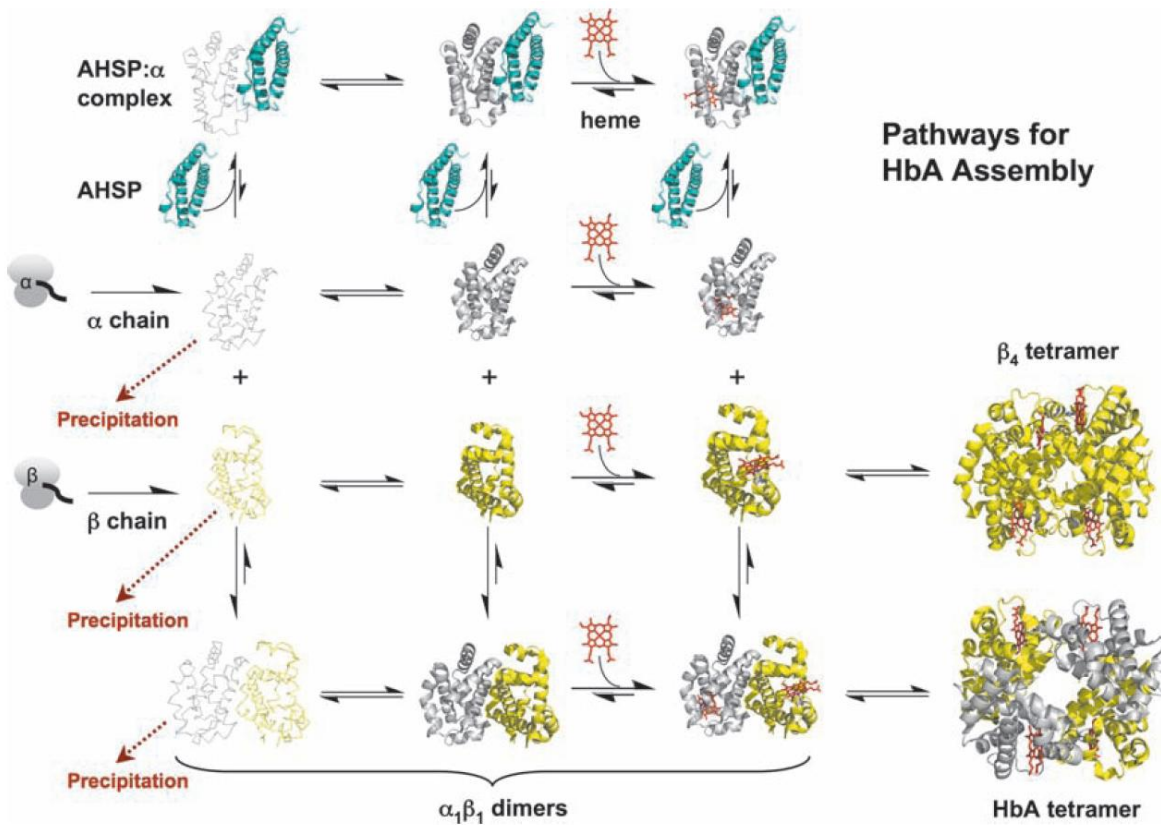
Las cadenas  $\beta$  de globina son más estables que las  $\alpha$  y por lo tanto, no necesitan la interacción con una chaperona. Después de la asociación covalente con el grupo hemo las cadenas  $\beta$  se auto asocian para formar homotetrámeros ( $\beta_4$ ) llamados hemoglobina H (Hb H). Al contrario, los monómeros de cadena  $\alpha$  libres son altamente inestables y no se agrupan para formar tetrámeros, sin embargo, tienden a agregarse y precipitar dañando la membrana del precursor eritroide disparando la apoptosis (eritropoyesis ineficaz) y acortando la vida media de los eritrocitos circulantes [19].

Además, durante la auto oxidación los monómeros de cadena  $\alpha$  tienden a producir especies reactivas de oxígeno (ROS), vía reacciones químicas catalizadas por el hierro del grupo hemo [19].

### III.8.3 ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES DE LA HEMOGLOBINA

Las propiedades fisiológicas de la hemoglobina, dependen del ensamblaje ordenado de las subunidades en las células hematopoyéticas. Una vez sintetizadas las cantidades adecuadas tanto de cadena  $\alpha$  como  $\beta$  y el grupo hemo haya sido insertado, daría comienzo la primera etapa de ensamblaje, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se combinan para formar la interfase  $\alpha_1\beta_1$ , que involucra interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. En

una segunda etapa, 2 heterodímeros  $\alpha\beta$  se asocian formando la interfase  $\alpha_1\beta_2$ , en la cual participan más interacciones polares [19]. De este modo se obtiene el heterotetrámero que constituye la hemoglobina (Figura 8).



**Figura 8: Vías para el ensamblaje de la Hb A.**

Extraída de: Mollan TL, Yu X, Weiss MJ, Olson JS. The role of alpha-hemoglobin stabilizing protein in redox chemistry, denaturation, and hemoglobin assembly. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(2):219-31. En la figura se reflejan los eventos postraduccionales de la biosíntesis de la Hb A.

Una síntesis eficiente de hemoglobina requiere la producción equilibrada de cadena  $\alpha$  y  $\beta$ , permitiéndose un ligero desajuste en la biosíntesis debido a los eficaces mecanismos proteolíticos de los precursores eritroides, los cuales contribuyen a evitar las consecuencias que derivan de la acumulación de alguna de las cadenas que se produzcan en exceso. Este mecanismo de control se pone de manifiesto en situaciones en las que existe un déficit de síntesis de una de las cadenas, pero sin embargo, no son capaces de contrarrestar el desequilibrio de síntesis que se produce como consecuencia

de genes defectuosos, cuya expresión se encuentra disminuida, produciéndose en estos casos, cuadros clínicos como las talasemias.

### **III.9 ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS Y SECUENCIA DE CADENAS DE GLOBINA**

Las hemoglobinopatías son alteraciones de la hemoglobina que suelen tener su origen en una alteración genética en los genes que codifican la síntesis de las cadenas de globina. Clásicamente se han reconocido dos tipos de anomalías en la patología de la hemoglobina: hemoglobinopatías estructurales y talasemias.

Este grupo de afecciones se caracterizan por su heredabilidad y que afectan al normal funcionamiento de los hematíes; sus manifestaciones clínicas son muy variadas y van desde casos asintomáticos hasta graves, estos últimos constituyen un importante problema de salud pública y en los pacientes y sus familias ocasionan sufrimiento desde su nacimiento [21].

#### **III.9.1 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES**

Las hemoglobinopatías estructurales son desórdenes hereditarios de la síntesis de la hemoglobina, en los cuales se ve alterada la secuencia de una de las cadenas de globina que forman la hemoglobina. Se trata de una alteración cualitativa en la síntesis de hemoglobina, es decir, existe una variación en la estructura primaria de una o varias de las subunidades que forman el tetrámero de la hemoglobina.

Se han descrito más de 1.000 variantes de hemoglobina [22], de las cuales, alrededor de la mitad no dan lugar a patología alguna. En los casos patológicos las mutaciones pueden producir polimerización de la hemoglobina anómala por alteración de la carga superficial (Hb S, Hb C), precipitación de la hemoglobina dentro del hematíe

(hemoglobinas inestables), cambios en la afinidad por el oxígeno (poliglobulia y cianosis) o aumento de la oxidación del hierro del grupo hemo (metahemoglobinas o Hb M). Además, las hemoglobinopatías pueden tener alterada su movilidad electroforética lo cual contribuye a su identificación tanto de forma intencionada como casual [21].

### III.9.2 TALASEMIAS

Las talasemias son un grupo heterogéneo de anemias hereditarias desde el punto de vista molecular, clínico y hematológico; caracterizadas por la disminución o ausencia total de síntesis de una o varias cadenas de globina. La cadena sintetizada en menor cuantía es, por lo general, rigurosamente normal en su composición y estructura.

En condiciones normales, la producción de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  en el adulto se realiza de modo equilibrado, permitiendo la formación de tetrámeros  $\alpha_2\beta_2$  que constituyen la Hb A. En las talasemias la producción deficitaria de una o más cadenas origina una reducción en la concentración intracelular de la hemoglobina (hipocromía), junto con una disminución del tamaño del eritrocito (microcitosis). La cadena no afectada continúa produciéndose en cantidades normales y su acúmulo excesivo puede alterar la maduración y función de los eritrocitos.

Las alteraciones genéticas fundamentalmente se concentran en regiones no codificantes, aunque existe un pequeño porcentaje de casos en los cuales la alteración se localiza en los exones y sin embargo, presentan un cuadro talasémico. Estos casos se engloban dentro de las hemoglobinopatías estructurales, puesto que tienen alterada su secuencia de aminoácidos, pero como en el caso de las talasemias el resultado final es una disminución de la síntesis de hemoglobina.

### III.10 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Como ya se ha comentado las hemoglobinopatías estructurales son alteraciones hereditarias de la síntesis de la hemoglobina de tipo cualitativo, es decir, la síntesis de hemoglobina no se encuentra disminuida sino que existe una variación en la estructura primaria de una o varias de las subunidades que forman el tetrámero de la hemoglobina [23]. El cambio puede ser benigno y el portador es clínica y hematológicamente silente, sin embargo, las propiedades físicas de algunas variantes pueden modificarse de tal manera que originen efectos patológicos severos [23].

Casi la totalidad de las hemoglobinopatías son el resultado de una mutación puntual, a nivel de un único nucleótido, mientras que tan sólo unas pocas se originan a consecuencia de la delección o adición de varias bases. En estos casos el mecanismo involucrado es una mutagénesis de tipo *frameshift* que se da en lugares donde existen cortas repeticiones de nucleótidos flanqueando la región mutada [24, 25].

Aunque la práctica totalidad de estas variantes tienen una significación clínica limitada, la mayoría han sido identificadas porque alguna de sus funciones o características están alteradas, ya sea su afinidad por el oxígeno, polimerización, estabilidad o movilidad electroforética [26]. Esta última modificación se ha aprovechado para poner de manifiesto e identificar, las variantes que tienen modificada la carga eléctrica superficial, bien electroforéticamente y/o cromatográficamente.

En este sentido la técnica *gold* estándar para la detección y cuantificación de las hemoglobinas desde el siglo pasado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico. Esta técnica también es utilizada en el control de la *diabetes mellitus*, mediante la medida de la hemoglobina glicada (HbA1c) [27, 28]. En algunos casos las variantes estructurales de hemoglobina pueden causar interferencia

analítica en la medición de la HbA1c, poniendo en riesgo el correcto diagnóstico y tratamiento de la diabetes [28].

En cuanto a la nomenclatura de las hemoglobinas anómalas, en primer lugar se fueron designando con letras del alfabeto, pero pronto se quedó pequeño. Se comenzó entonces a denominarlas con el nombre de donde eran los pacientes, como la Hb La Coruña; sitios emblemáticos del país donde fueron identificadas por primera vez (Hb Complutense, Hb El Escorial) o incluso el nombre de la familia (Hb Lepore). En otros casos haciendo mención de alguna de sus características como la Hb S, la cual se denomina “S” porque es una hemoglobina lenta, *slow* en inglés.

A parte existe una nomenclatura lógica e informativa, la cual identifica la cadena, la localización y el aminoácido sustituido como por ejemplo la Hb Plasencia [ $\alpha_2$  CD125(H8)Leu>Arg].

### **III.10.1 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES POR MUTACIÓN SUPERFICIAL**

Prácticamente, todas las mutaciones de este tipo originan variantes de hemoglobinas que, desde el punto de vista clínico, en el estado heterocigoto son asintomáticas, porque se producen en zonas que no son importantes para el funcionamiento normal de la hemoglobina, como es el caso de la Hb C [ $\beta$  CD6(A3)Glu>Lys] [2]. Algunos ejemplo de hemoglobinopatías de cadena  $\alpha$  clínicamente silentes serían la Hb J-París [ $\alpha_2$  CD12(A10)Ala>Asp] o la Hb Le Lamentin [ $\alpha_2$  CD20(B1)His>Gln] [29, 30].

Aunque sin duda, la hemoglobinopatía más conocida por su elevada frecuencia en poblaciones de ascendencia africana es la Hb S [ $\beta$  CD6(A3)Glu>Val]. En la Hb S la

## INTRODUCCIÓN

sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena  $\beta$  por valina induce una profunda alteración de las propiedades físico-químicas de la molécula de hemoglobina, que polimeriza a baja presión de oxígeno, formándose largos filamentos que posteriormente se asocian en espiral, distorsionando la estructura del eritrocito y adoptando forma de hoz. Estos eritrocitos aumentan la viscosidad sanguínea y bloquean la circulación capilar en diferentes áreas del organismo, dando lugar a fenómenos de oclusión venosa [2].

La Hb S es la hemoglobinopatía más frecuente en todo el mundo. Su forma heterocigota (rasgo drepanocítico) afecta a un 20-40% de la población negra africana y, en Estados Unidos, al 8% de la población negra; también se ha identificado en países de la cuenca mediterránea, como Italia y Grecia, y en algunas zonas del subcontinente indio. La hemoglobinopatía S, al igual que la talasemia parece conferir protección frente al paludismo, por lo que el gen puede haber resistido a lo largo del tiempo [2].

En estado homocigoto, la enfermedad se denomina anemia de células falciformes o anemia drepanocítica. Se caracteriza por una anemia crónica con episodios de crisis hemolíticas, tendencia a infecciones e infartos múltiples que se producen en los diferentes órganos. La gravedad depende de la concentración de Hb F, de forma que, cuando es superior al 10%, está disminuida la posibilidad de que el hematíe sufra cambios irreversibles de su forma y función, y por lo tanto el pronóstico es más benigno [2].

### III.10.2 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES INESTABLES

Los portadores de hemoglobinas inestables tienen un síndrome anémico debido a la precipitación postraducional de las cadenas anómalas. Este tipo de variantes de hemoglobina suponen alrededor de un 9'5% de las hemoglobinopatías estructurales y es importante tenerlas en cuenta porque son difíciles de detectar por técnicas electroforéticas o cromatográficas [31].

La anomalía responsable de la inestabilidad de la cadena o de la hemoglobina, puede actuar por diferentes mecanismos o niveles. En algunas hemoglobinas hiperinestables se encuentra afectado el bolsillo del hemo, como en la Hb Agrinio [ $\alpha_2$  CD29(B10)Leu>Pro] donde se ve afectado un residuo altamente conservado en la evolución ya que es fundamental para generar el entorno hidrofóbico necesario para la unión distal del grupo hemo [32].

En otras se produce una interferencia con la estructura alfa-hélice alterándose la estructura secundaria. Un ejemplo lo constituye la Hb Tunis-Bizerte [ $\alpha_1$  CD129(H12)Leu>Pro], en la cual la sustitución por el aminoácido Pro interrumpe la hélice H de la cadena  $\alpha$  de globina ocasionando una cadena inestable [33].

En otros casos como en la Hb Plasencia [ $\alpha_2$  CD125(H8)Leu>Arg], se ve afectada la estructura terciaria como consecuencia del reemplazo de un aminoácido no polar interno por uno polar [34]. Otras se originan por una interferencia en la unión de las subunidades alfa-beta como en la Hb Iberia [ $\alpha_2$  CD104(G11)Cys>Arg] [35], o en la unión con la chaperona AHSP como en la Hb Groene Hart [ $\alpha_1$  CD119(H2)Pro>Ser] [36].



Por último están las que generan la elongación de la cadena de globina, como la Hb Pak Num Po [ $\alpha_1$  132(+T); secuencia C-terminal modificada: (132)Cys-Glu-His-Arg-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-Leu-Gly-Gly-His-Ala-Ser-Cys-Pro-Leu-Gly-Leu-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Leu-Pro-Ala-Pro-Val-Pro-Pro-Trp-Ser-Leu-Asn-Lys-(175)Val-COOH], las cuales posiblemente por un mecanismo de oxidación de la cadena proteica precipiten dañando la membrana del eritrocito y ocasionando una anemia hemolítica [37, 38].

### **III.10.3 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES CON AFINIDAD ALTERADA POR EL OXÍGENO**

Los contactos  $\alpha_1\beta_2$  son muy importantes para el efecto de cooperación entre los grupos hemo durante el proceso de oxigenación. Las sustituciones en esta zona originan variantes con la afinidad por el oxígeno alterada, al igual que las sustituciones en la cavidad central cuando se rompen los puentes salinos, que estabilizan la estructura de la hemoglobina, o bien cuando se alteran los lugares de unión al 2,3-DPG, si las mutaciones tienen lugar en los contactos  $\alpha_1\beta_1$  [2].

Cuando la sustitución hace que la curva de disociación del oxígeno se desvíe hacia la izquierda, se obtiene una variante con la afinidad por el oxígeno elevada, al no liberarse oxígeno a los tejidos y se produce hipoxia tisular. Como compensación, se produce un aumento en la síntesis de eritropoyetina y una eritrocitosis secundaria o poliglobulia [2]. Un ejemplo lo constituye la Hb J-Cape Town [ $\alpha$  CD92(FG4)Arg>Gln]. En esta variante se encuentra alterado el contacto  $\alpha_1\beta_2$  lo cual repercute en un aumento de la afinidad por el oxígeno y descenso de la cooperatividad entre las subunidades de la hemoglobina. Los pacientes portadores de la Hb J-Cape-Town muestran una leve eritrocitosis como consecuencia de dicha alteración molecular [39].

Cuando la sustitución desplaza el equilibrio hacia la forma desoxigenada, se trata de una variante con afinidad disminuida por el oxígeno. En general estos pacientes son asintomáticos. Estas variantes se asocian con suficiente oxígeno en los pulmones, a pesar de su menor afinidad por el mismo, y se saturan por completo. Si la afinidad por el oxígeno es muy baja, los pacientes presentan cianosis debido a la presencia de grandes cantidades de desoxihemoglobina en la sangre arterial [2], un ejemplo lo constituye la Hb Bassett [ $\alpha$  CD94(G1)Asp>Ala] [40].

### III.10.4 METAHEMOGLOBINEMIAS O HB M

Son alteraciones congénitas de la hemoglobina, en las que, generalmente, la histidina proximal (F8) o distal (E7) de la cavidad del grupo hemo está sustituida por tirosina. La tirosina es un aminoácido más grande que la histidina y posee una carga negativa que acepta compartir con el oxígeno y, al unirse al hierro, estabiliza su forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e impide la unión reversible al oxígeno molecular, no produciéndose aporte de oxígeno a los tejidos y ocasionándose cianosis. Se conocen cinco variantes, 3 de la cadena  $\beta$  y 2 de la  $\alpha$  (Hb M-Iwate [ $\alpha$  CD87(F8)His>Tyr] y Hb M-Boston [ $\alpha$  CD58(E7)His>Tyr]) [2, 22].

Cuando la variante es de cadena  $\alpha$  la cianosis está presente desde el nacimiento, mientras que si la alteración es en la cadena  $\beta$  la cianosis no empieza hasta los seis meses, momento en el cual la mayoría de la Hb F ya ha sido sustituida por la Hb A. Los pacientes con Hb M son cianóticos pero generalmente se mantienen asintomáticos mientras no se expongan a drogas o toxinas capaces de oxidar la hemoglobina. La expectativa de vida no se encuentra afectada en los pacientes con Hb M en heterocigosis, aunque se piensa que los homocigotos son incompatibles con la vida [41].

La clínica de estos pacientes se agrava a medida que aumentan los niveles de Hb M, así por ejemplo, para valores inferiores al 15% tan sólo se observa una pigmentación grisácea en la piel; para valores entre el 15 y el 30% la sangre se vuelve de color “chocolate” y existe una cianosis central que no responde a la administración de oxígeno; con Hb M superiores al 30% aparecen síntomas neurológicos y cardiovasculares y a medida que sus niveles aumentan el paciente evoluciona con reducción del nivel de conciencia, depresión respiratoria, shock y muerte. Niveles de Hb M por encima del 70% son generalmente letales [41].

### **III.10.5 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES CON CAMBIO DE MOVILIDAD**

Las hemoglobinopatías además de tener alterada su funcionalidad pueden tener alterada su movilidad electroforética. En otros casos la hemoglobinopatía es silente pero sin embargo, el cambio de aminoácido es capaz de perturbar ligeramente la carga o estructura de la molécula hecho que genera una movilidad distinta de la Hb A.

En estos casos, a pesar de la ausencia de repercusión clínica, pueden producir una interferencia en la determinación analítica de algunos parámetros como puede ser la Hb glicada en los pacientes diabéticos [42].

### **III.10.6 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES NO GENÉTICAS**

Son un grupo de trastornos de la hemoglobina que no tienen un origen genético. Se denominan adquiridas y son secundarias a diversas condiciones:

- Metahemoglobina debida a la exposición a tóxicos.
- Sulfohemoglobina debida a exposición a tóxicos.

- Carboxihemoglobina: el monóxido de carbono tiene más afinidad por la hemoglobina que el oxígeno, pudiendo sustituirlo y reduciendo su suministro. La elevación crónica de la concentración de carboxihemoglobina hasta un 10 a 15%, como sucede en los fumadores, puede conducir a una poliglobulia secundaria. La carboxihemoglobina, da un color rojo cereza a la sangre, y enmascara la cianosis, que normalmente acompaña a un aporte deficiente de  $O_2$  a los tejidos.
- Hb H en eritroleucemia.
- Hb F elevada en estados de estrés eritroide y displasia de la médula ósea.

### III.11 TALASEMIAS

Las talasemias constituyen un grupo complejo de anemias congénitas, en las que se produce un defecto de síntesis de una o más subunidades de globina. Al contrario que las hemoglobinopatías estructurales, se trata de una alteración cuantitativa, es decir, las cadenas de globina sintetizadas son funcionales, pero en menor cuantía originándose un desequilibrio entre cadenas  $\alpha$  y no- $\alpha$ . Este desequilibrio en las cadenas genera hemólisis y dificulta la eritropoyesis [43].

Las talasemias se pueden clasificar en base a diversos criterios. Si atendemos a la cadena afectada, podemos hablar de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , o  $\epsilon$ -talasemia. Si nos fijamos en su forma de manifestarse, tenemos las formas de portador silente, rasgo talasémico, talasemia intermedia o talasemia grave (talasemia mayor). Las  $\alpha$  y  $\beta$  talasemias se dividen a su vez, en formas  $\alpha^0$  y  $\beta^0$ , en las que no se produce la síntesis de la cadena afectada, y en formas  $\alpha^+$  y  $\beta^+$ , cuando la cadena se sintetiza aunque en cantidad reducida [2].

## INTRODUCCIÓN

La repercusión fisiopatológica y las consecuencias clínicas derivadas de estos trastornos vienen determinadas, en primer lugar, por el hecho de que, al sintetizarse menos cantidad de una cadena de globina, se forma menos hemoglobina normal, causando la aparición de una anemia microcítica e hipocroma. Por otro lado, existe otro mecanismo que desempeña un papel fundamental en la anemia que caracteriza a la talasemia, y que consiste en que la cadena producida en cantidad normal, al no poderse aparear con la cadena deficitaria, se agrupa en homotetrámeros más o menos estables o precipita en el interior del eritrocito, produciendo alteraciones en la maduración y supervivencia [2].

En la  $\alpha$ -talasemia durante el periodo fetal, la deficiencia de cadena  $\alpha$  condiciona el agrupamiento en homotetrámeros de la cadena  $\gamma$  apareada, lo que da lugar a la formación de la hemoglobina Bart ( $\gamma_4$ ). Tras el nacimiento, al ir aumentando gradualmente la producción de cadena  $\beta$  y disminuyendo las cadenas  $\gamma$ , se forma un homotetrámero conocido como hemoglobina H ( $\beta_4$ ). La fisiopatología de la  $\alpha$ -talasemia es, por tanto, diferente antes y después del nacimiento.

En el periodo fetal, la Hb Bart, al ser un tetrámero y carecer de efecto hemo-hemo tiene una gran afinidad por el oxígeno, lo que condiciona una hipoxia hística. En la hidropesía fetal por Hb Bart, ésta constituye el 80% del total de la hemoglobina circulante y la hipoxia conduce a la muerte del feto intraútero o poco después de nacer. En estos casos, la hepatoesplenomegalia es masiva, debida a una eritropoyesis extramedular compensatoria.

La Hb H presente en la época postnatal es bastante estable y precipita lentamente, por lo que la muerte intramedular de los eritroblastos no es muy elevada. La formación de cuerpos de inclusión en los eritrocitos circulantes origina una hemólisis en

lugar de una eritropoyesis ineficaz, por lo tanto, las principales alteraciones en la enfermedad de la Hb H serán la anemia y la hemólisis, en lugar de la eritropoyesis ineficaz y la sobrecarga férrica. Esto es lo que hace que, en este tipo de talasemias, la anemia hemolítica sea leve o moderada, y que el grado de eritropoyesis ineficaz sea mucho menor que en la  $\beta$ -talasemia [2].

Otra consecuencia importante que se deriva de la formación de Hb Bart y Hb H es que estas hemoglobinas poseen gran afinidad por el oxígeno al no presentar el efecto hemo-hemo, lo que las inhabilita para transportar este gas, ya que no pueden cederlo a los tejidos.

Por lo tanto, en las talasemias, se encuentra una anemia microcítica e hipocroma, a la que se le añade un determinado componente hemolítico. Esta anemia se asocia, en el paciente homocigoto a una sobrecarga férrica, en parte debida al soporte trasfusional, así como a un incremento de la absorción de hierro por la eritropoyesis ineficaz [2].

La anemia talasémica puede también, verse aumentada por la deficiencia de ácido fólico, que se desarrolla en los sujetos afectados por las formas severas, a causa de los masivos requerimientos de esta sustancia como consecuencia de la hiperplasia eritroide medular.

### III.11.1 $\alpha$ -TALASEMIA

Como se ha descrito anteriormente la  $\alpha$ -talasemia está causada por la deficiencia o ausencia de cadenas  $\alpha$  de globina.

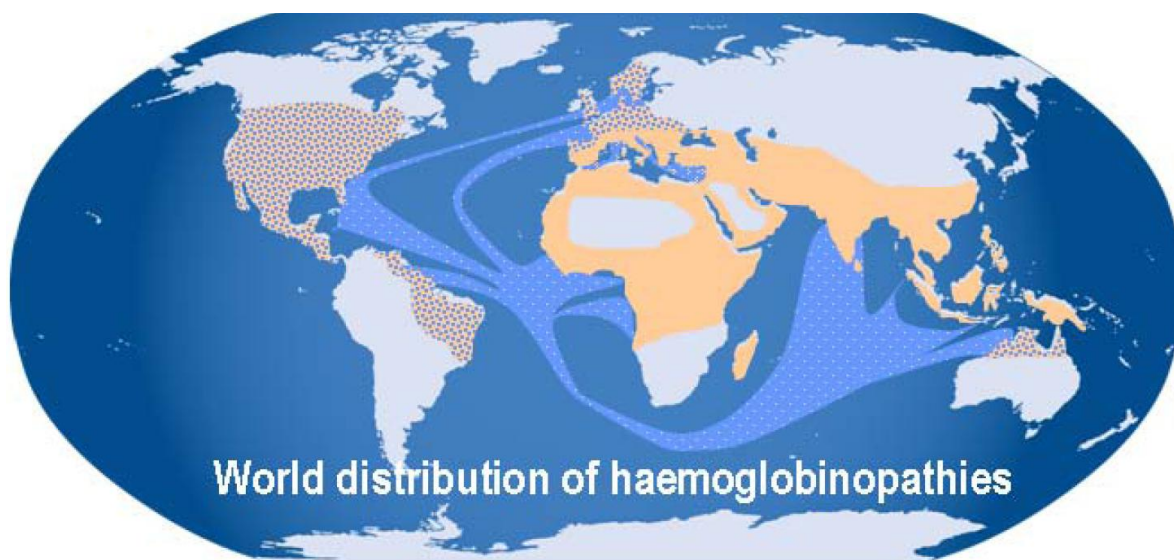
#### III.11.1.1 Epidemiología de las $\alpha$ -Talasemias

Son enfermedades muy frecuentes, llegando a suponer en conjunto, las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo. De hecho se estima que el 5,2% de la población mundial es portadora de una alteración en la síntesis de la hemoglobina, y el 2,7 por mil de los nacimientos en el mundo va a presentar una de estas variantes sintomática. No obstante, presentan una incidencia muy variable de unas regiones a otras, de esta forma, en algunos países como los del norte de Europa su prevalencia es muy baja y en otros son tan comunes que constituyen un importante problema de salud pública [6, 44].

La  $\alpha$ -talasemia es especialmente frecuente en la cuenca Mediterránea, el sudeste asiático, África, Oriente Medio y el subcontinente indio. Estas zonas se superponen a las áreas que tradicionalmente han sido endémicas para la malaria y esto es porque los portadores de  $\alpha$ -talasemia parecen tener una ventaja selectiva frente a la malaria por la infección de *Plasmodium falciparum* [6, 44]. Dentro de estas zonas de alta prevalencia, además se ha observado una mayor frecuencia de casos de talasemia en regiones costeras con menor altitud que en las zonas montañosas con mayor altitud donde la transmisión de la enfermedad por el mosquito *Anopheles sp* no ocurre [6].

No obstante, con los masivos movimientos migratorios que han tenido lugar durante las pasadas décadas así como los matrimonios mixtos entre grupos étnicos diferentes, la incidencia de esta patología está aumentando en países del norte de Europa y en Norteamérica [44] (Figura 9).

Según algunas fuentes, se estima que alrededor del 15% de la población global (80-90 millones de personas) son portadoras de un gen de hemoglobina anómalo, con entre 300.000 y 500.000 niños afectados anualmente. De acuerdo con los registros del TIF (Thalassemia International Federation), solamente hay registrados alrededor de 200.000 pacientes con las formas graves de la enfermedad que están vivos y recibiendo tratamiento en todo el mundo, subrayando la triste realidad de que la mayoría de los niños nacidos en países en desarrollo, mueren sin diagnóstico, mal diagnosticados, con mal tratamiento, no tratados o todo a la vez.



**Figura 9: Distribución mundial de la  $\alpha$ -talasemia.**

Extraída de: Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(1):13. La prevalencia ha crecido en áreas previamente no endémicas para la malaria a consecuencia de los flujos migratorios.

### III.11.1.2 Formas clínicas

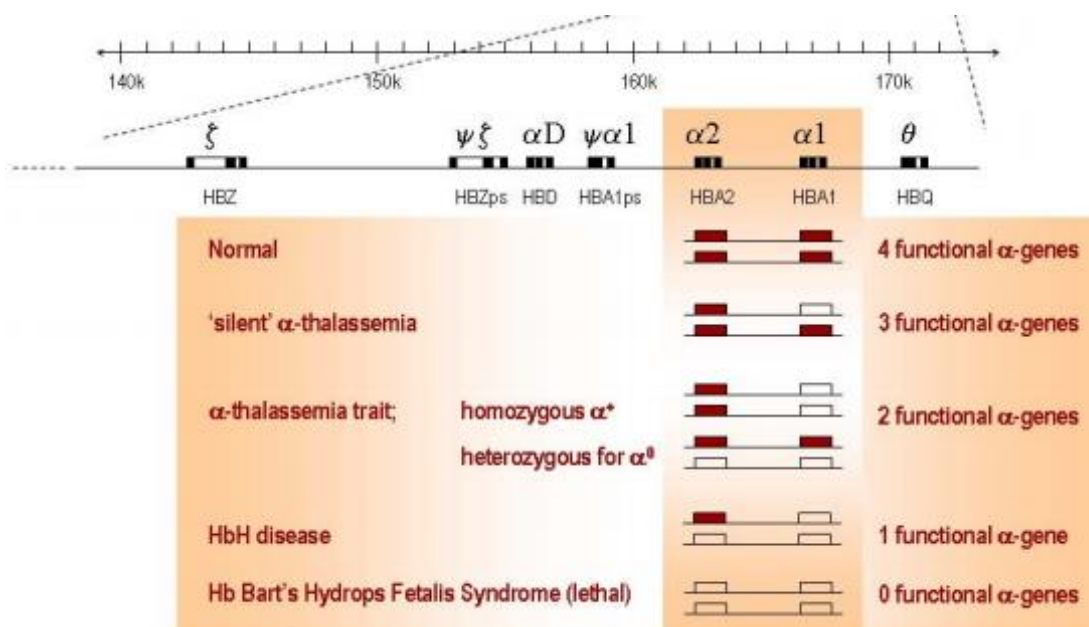
Dada la gran heterogeneidad de las lesiones moleculares de las  $\alpha$ -talasemias, las manifestaciones clínicas pueden ser muy variadas, abarcando desde un estado de portador silente, hasta una enfermedad grave incompatible con la vida, como sucede en la hidropesía fetal. La gravedad del fenotipo de la  $\alpha$ -talasemia está relacionada con la pérdida de la síntesis de la cadena  $\alpha$  de globina. En ella intervienen varios tipos de



## INTRODUCCIÓN

factores: El número de genes afectados, el grado en que la mutación disminuye la expresión del gen lesionado y el grado en que el gen dañado contribuye a la síntesis de globina  $\alpha$ . Es decir, como el gen de globina  $\alpha_2$  se expresa aproximadamente 2,6 veces con más intensidad que el gen de globina  $\alpha_1$ , la pérdida de un gen  $\alpha_2$  tendrá un mayor impacto que la pérdida de un gen  $\alpha_1$  [2].

Se distinguen principalmente 4 formas clínicas: portador silente, rasgo talasémico, enfermedad de la Hb H e hidropesía fetal por Hemoglobina Bart (Figura 10).



**Figura 10: Formas clínicas y su correlación con el fenotipo génico.**

Modificada de: Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(1):13.

El fenotipo clínico de la mayoría de los individuos con  $\alpha$ -talasemia es muy suave y puede no ser informado durante toda la vida a no ser que se realice un recuento completo de sangre de manera rutinaria [44].

**A) Portador silente**

Corresponde a la pérdida de un gen alfa en un alelo ( $\alpha^+$ -talasemia heterocigota). Desde el punto de vista fenotípico, son pacientes asintomáticos, y en la detección por el laboratorio es difícil diferenciarlos de las personas normales, ya que su Volumen Corpuscular Medio (VCM) puede ser normal o de alrededor de 80fL, excepto en niños que pueden cursar con volúmenes de alrededor de 70-75fL, la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) es normal o está en el límite bajo de la normalidad, y el resto de los parámetros hematológicos (Hb A<sub>2</sub> y Hb F) son normales [2]. En neonatos puede haber entre 1-2% de Hb Bart en los tres primeros meses de vida.

Así pues al no presentar microcitosis ni anemia, su diagnóstico se ha de realizar por técnicas de biología molecular y mediante estudios familiares.

**B) Rasgo talasémico**

Consiste en la supresión funcional de dos genes de globina  $\alpha$ . La causa más frecuente de rasgo talasémico es la delección de un gen  $\alpha$  en cada cromosoma [ $\alpha^+$ -talasemia homocigota ( $-\alpha/-\alpha$ )]. Otra causa, aunque menos frecuente, es la pérdida de dos genes  $\alpha$  en el mismo cromosoma ( $--/\alpha\alpha$ ) denominándose  $\alpha^0$ -talasemia heterocigota. Las formas  $\alpha^+$ -talasemia generalmente resultan de delecciones de 3,7Kb o 4,2Kb, que suprimen uno de los genes  $\alpha$  ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ). La  $\alpha^0$ -talasemia se produce por delecciones más o menos amplias, que abarcan desde 5,2Kb hasta más de 100Kb, en donde se suprimen dos genes  $\alpha$ .

Estos enfermos presentan anemia microcítica (VCM=60-70fL) e hipocroma (HCM=20-25pg), por lo que en muchas ocasiones van a ser confundidas con anemias ferropénicas Su diagnóstico se basa en un defecto de síntesis *in vitro* de las cadenas  $\alpha$

(ratio  $\alpha/\beta$  próximo a 0,7), valores normales de Hb A<sub>2</sub> y Hb F, ausencia de ferropenia y en los casos de  $\alpha^0$ -talasemia heterocigota la presencia de algunos cuerpos de inclusión de Hb H. El diagnóstico debe ser confirmado por biología molecular [2].

### **C) Enfermedad de la Hb H**

Se produce por una falta de función de tres genes  $\alpha$ , como resultado de la herencia de una  $\alpha^+$ -talasemia de uno de los progenitores y una  $\alpha^0$ -talasemia del otro. Es el más severo de los fenotipos de  $\alpha$ -talasemia compatible con la vida. El genotipo más común asociado con la enfermedad de la Hb H es ( $--/-\alpha$ ). Otros genotipos frecuentes son la interacción de la Hb Constant Spring con el determinante  $\alpha^0$ , la coexistencia de una delección  $\alpha^0$  con  $\alpha$ -talasemia no delección ( $--/\alpha^T\alpha$ ) o defecto homocigoto no delección ( $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ).

En general el cuadro clínico se manifiesta con una talasemia de curso clínico intermedio, con anemia moderada muy variable, con rangos de concentraciones de hemoglobina muy amplios, generalmente inferiores a 10g/dL. Su clínica puede ser muy diversa, desde una forma moderadamente severa hasta un cuadro hemolítico con fatiga, malestar general, colelitiasis, úlceras maleolares crónicas y esplenomegalia moderada que ocasionalmente puede complicarse por hiperesplenismo. Otras complicaciones incluyen infecciones, déficit de ácido fólico y episodios de hemólisis agudas en respuesta a drogas e infecciones [44-46].

Esta anemia puede ir acompañada de ictericia y presencia de Hb H (0,8-40%), ocasionalmente acompañada de hemoglobina Bart en la sangre periférica. El grado de ictericia es variable y los niños podrían mostrar retraso en el crecimiento [44-46].

Desde el punto de vista hematológico se caracteriza por ser una anemia microcítica e hipocroma con marcadas alteraciones morfológicas de los hematíes con poiquilocitosis y dianocitos. Los reticulocitos están aumentados, detectándose cuerpos de inclusión de Hb H en más del 50% de los eritrocitos. El diagnóstico se corrobora mediante técnicas electroforéticas y/o cromatográficas, observándose un pico rápido de Hb H (2-20%) a la que, a veces se suma la Hb Bart. El fenotipo es caracterizado molecularmente.

#### **D) Hidrops Fetalis por Hemoglobina Bart**

Corresponde a la pérdida de los cuatro genes alfa [ $\alpha^0$ -talasemia homocigota (--/--)] o en algunos casos se debe a la herencia de una mutación no delección severa de un progenitor y ningún gen alfa del otro (--/ $\alpha^T\alpha$ ). El periodo gestacional suele ser complicado, apareciendo con frecuencia eclampsias y hemorragias durante el pre y postparto. Esta forma de  $\alpha$ -talasemia es incompatible con la vida, aunque se han descrito algunos casos en los cuales el neonato ha recibido terapia intensiva como soporte vital, con transfusiones sanguíneas [44].

La muerte se produce de manera precoz intraútero o en el periodo neonatal. El cuadro clínico es similar a la hidropesía fetal originada por la incompatibilidad feto-materna (sistema Rh). Existe hepatoesplenomegalia, fallo cardíaco, edema generalizado, ascitis, cuadro de hematopoyesis extramedular, retraso en el crecimiento cerebral y esquelético, así como deformaciones cardiovasculares y un gran engrosamiento de placenta [44, 45].

Los niveles de hemoglobina al nacimiento oscilan entre 6 y 8g/dL, con eritroblastosis, incremento de los reticulocitos y marcadas alteraciones morfológicas de

la serie roja. La cuantificación de la Hb Bart supera el 80%, también se puede observar Hb Portland, que es la única funcional en estos fetos, y ausencia total de HbF y de HbA. El estudio de los progenitores debe confirmar que ambos son portadores de una  $\alpha^0$ -talasemia.

### III.11.1.3 Bases moleculares de las $\alpha$ -Talasemias

La herencia en las talasemias se rige por las leyes de Mendel y se transmiten a la prole con carácter autosómico recesivo. Los genes que codifican la alfa globina se encuentran situados en el brazo corto del cromosoma 16, en la región 16p13.3, cerca del telómero. En individuos normales la síntesis de globina está regulada por 4 genes  $\alpha$ , 2 copias en cada cromosoma y este genotipo se denota como  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . La expresión de estos genes es dependiente de elementos reguladores remotos [44, 47, 48].

La genética de la  $\alpha$ -talasemia es muy heterogénea, y al igual que el resto de las talasemias, desde el punto de vista molecular puede ser clasificada en defectos  $\alpha^+$  o  $\alpha^0$ , dependiendo de si existe una abolición parcial o completa de la producción de la cadena  $\alpha$  de globina, respectivamente.

La mayor parte de las  $\alpha$ -talasemias se producen por deleciones genéticas de uno o varios genes  $\alpha$ . Ocasionalmente, mutaciones puntuales en regiones críticas de los genes  $\alpha$  como las zonas de consenso de los intrones o en las secuencias de poliadenilación, entre otras, pueden alterar el procesamiento del ARNm, y dar lugar a la producción de  $\alpha$ -talasemia no deleción [44, 48]. Estos defectos moleculares de acuerdo a sus características genéticas se agrupan en dos grandes apartados,  $\alpha$ -talasemia deleción y  $\alpha$ -talasemia no deleción.

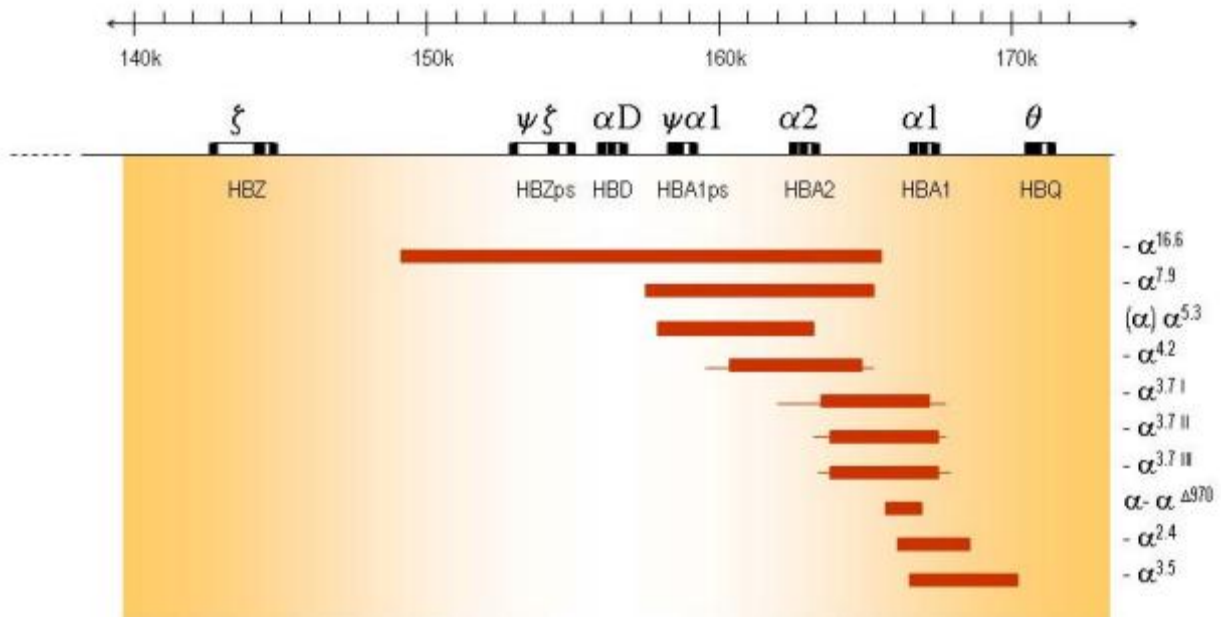
## A) $\alpha$ -Talasemia delección

La mayoría de las mutaciones causantes de  $\alpha$ -talasemias son originadas por deleciones que involucran un único gen y se denominan  $\alpha^+$ -talasemias. A pesar de ello, también existen deleciones que involucran a los dos genes  $\alpha$  de un cromosoma, constituyendo las llamadas  $\alpha^0$ -talasemias [48].

### A.1. $\alpha^+$ -Talasemia delección

Los genes  $\alpha$  de globina se encuentran embebidos dentro de dos unidades de 4Kb de gran homología. Estas regiones están divididas en segmentos homólogos (X, Y, Z) separadas por segmentos no homólogos (I, II, II) [14]. Este hecho permite una alineación inadecuada de los pares de cromosomas facilitando los fenómenos de recombinación recíproca durante la meiosis que están detrás de los dos eventos de delección que causan la pérdida de un solo gen de  $\alpha$ -globina, es decir, la delección de 3,7Kb y la delección de 4,2Kb [44, 49].

Además, han sido publicados un gran número de deleciones que originan la pérdida de un único gen  $\alpha$  y que son debidas a fenómenos de *crossing-over* o recombinación no homóloga, produciendo una disminución de la síntesis de cadena  $\alpha$  de globina, de ahí el nombre de  $\alpha^+$ -talasemia [44]. (Figura 11).



**Figura 11: Delecciones de un único gen  $\alpha$  causantes de  $\alpha^+$ -talasemia.**

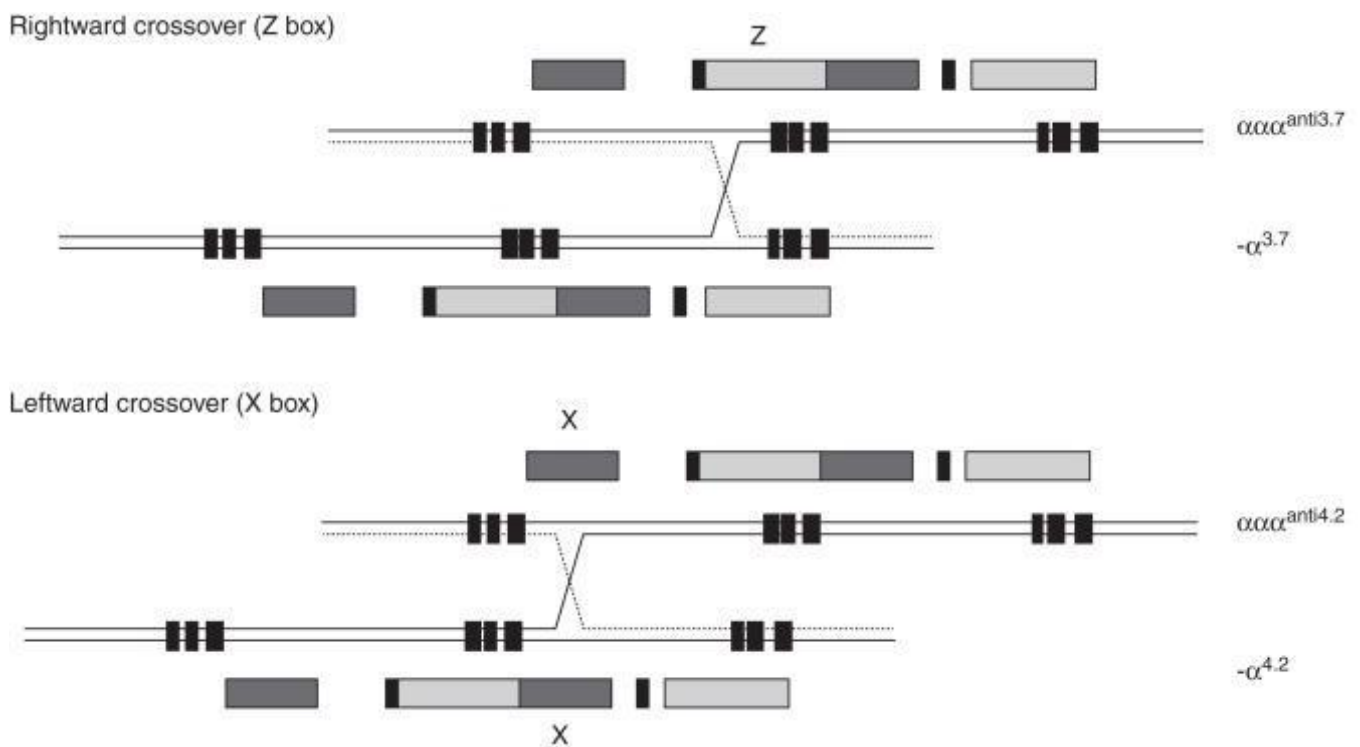
Extraída de: Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(1):13. Se muestran tres subtipos de 3,7Kb, la 4,2Kb y otras delecciones menos comunes.

La delección  $-\alpha^{3,7}$  es conocida también con el nombre de  $\alpha$  talasemia-2 *rightward* y es producto de la no alineación y recombinación recíproca de la región homóloga Zeta. Según el lugar en el que sucede el entrecruzamiento (I, II, III) se originan varios subtipos de la delección  $-\alpha^{3,7}$  [49]. La pérdida de 3,7Kb envuelve al gen  $\alpha_2$  produciendo un haplotipo ( $-\alpha^{3,7}$ ) y otro haplotipo ( $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ ) y ya que el gen  $\alpha_1$  se encuentra intacto sólo hay un gen activo. Por tanto existen tres subtipo (I, II y III) dependiendo del punto exacto de ruptura, así las delecciones II y III abarcan desde la mitad del gen  $\alpha_2$  hasta la mitad del gen  $\alpha_1$  (Figura 12) [14].

La delección  $-\alpha^{4,2}$  también se denomina  $\alpha$  talasemia-2 *leftward* y se origina por la no alineación y recombinación de la región homóloga X. Esta recombinación produce cromosomas con un único gen  $\alpha$  ( $-\alpha^{4,2}$ ) que

ocasionan  $\alpha$ -talasemia y otros cromosomas con 3 genes  $\alpha$  ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ ). De nuevo, en esta delección queda un gen  $\alpha_1$  intacto y activo (Figura 12) [14].

La delección  $-\alpha^{4.2}$  tiene una mayor prevalencia en el sudeste asiático mientras que la delección  $-\alpha^{3.7}$  es más frecuente en el área mediterránea [50]. La supresión funcional de uno de los genes  $\alpha$  permite la existencia de tres genes funcionales en los heterocigotos para uno de los tipos de  $\alpha$  talasemia-2, dando lugar a una  $\alpha^+$ -talasemia. En la mayoría de casos son asintomáticos y su detección por el laboratorio sólo es posible por técnicas de biología molecular.



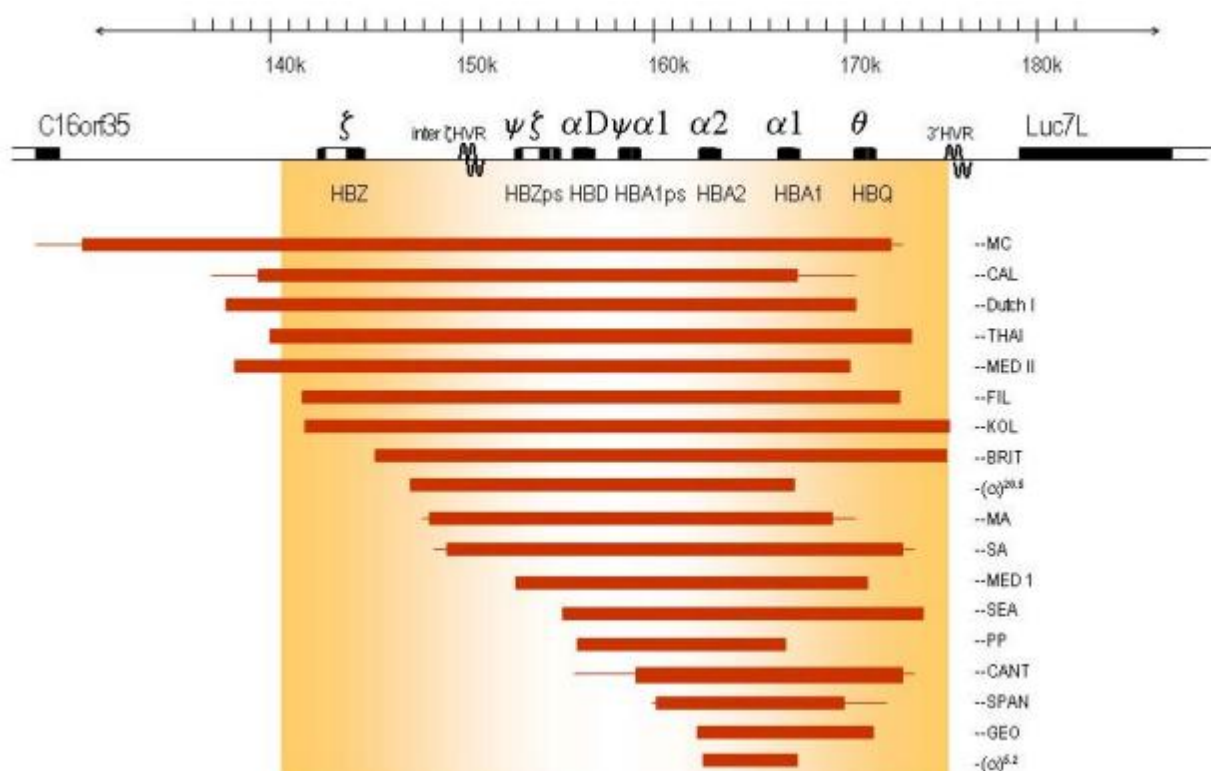
**Figura 12: Mecanismo de formación de la delección *rightward* y la delección *leftward*.**

Extraída de: Higgs DR. The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013; 3(1):a011718.



## A.2. $\alpha^0$ -Talasemia deleción

Este grupo de talasemias se producen por deleciones más o menos amplias que abarcan desde 5,2Kb hasta más de 100Kb; es decir, puede ocurrir desde la pérdida de tan sólo los dos genes  $\alpha$  en *cis* hasta la totalidad del *cluster*. El fenotipo de estas supresiones es más severo que el de los anteriores cuadros clínicos, ya que la deleción completa o parcial de ambos genes en *cis* impide la síntesis de cadena  $\alpha$  ( $\alpha^0$ -talasemia) a partir de ese cromosoma. Los homocigotos o heterocigotos compuestos para este tipo de deleciones dan lugar a un *Hidrops fetalis* [44]. (Figura 13).



**Figura 13: Deleciones de ambos genes  $\alpha$  causantes de  $\alpha^0$ -talasemia.**

Extraída de: Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(1):13.

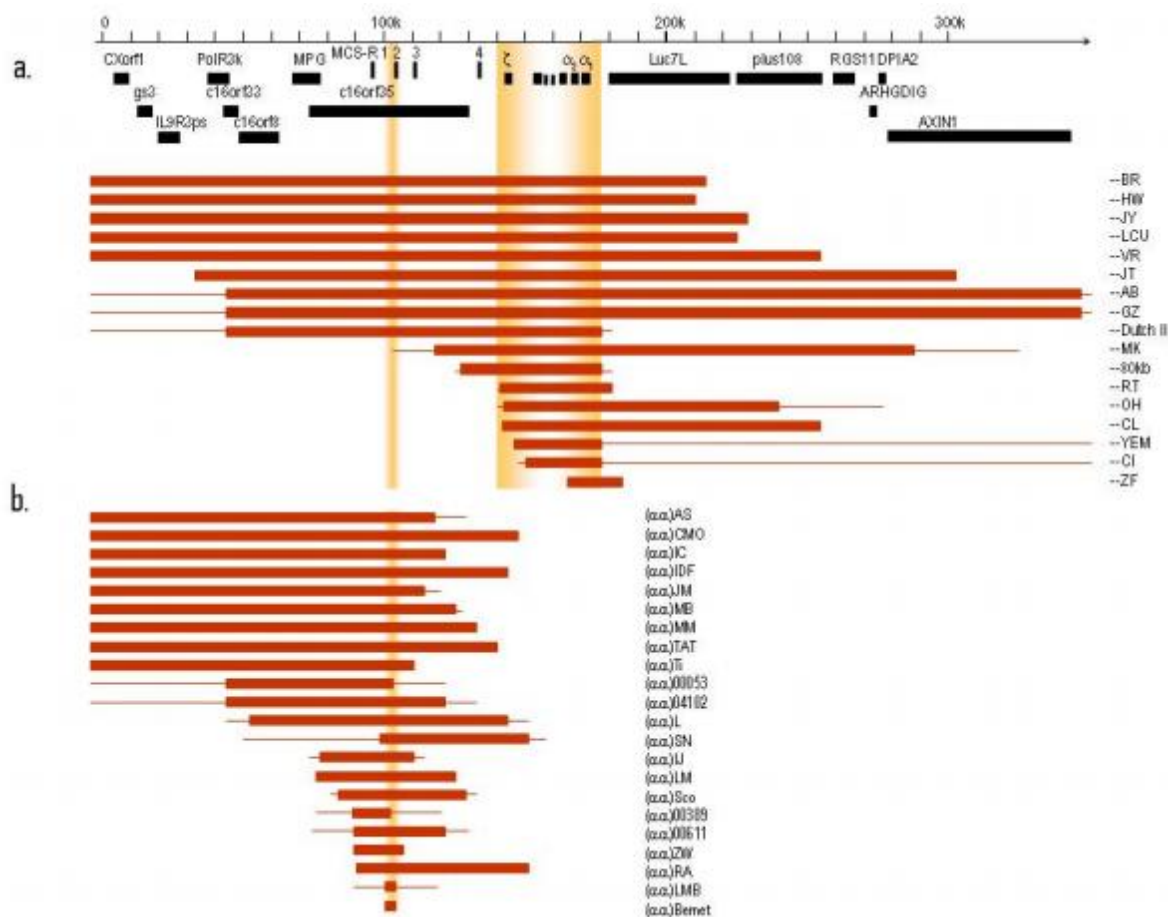
La mayoría de estas grandes deleciones se deben a las denominadas recombinaciones ilegítimas. Este término se utiliza para resaltar la ausencia de áreas homólogas. Se distinguen tres tipos de modelos que expliquen estos fenómenos:

- a) Puntos de corte en regiones no homólogas y re-unificación.
- b) Truncamiento del cromosoma.
- c) Recombinación entre secuencias homólogas como las de la familia Alu, particularmente frecuentes en el entorno del *cluster*  $\alpha$ . Es la más generalizada [45].

Algunas de estas deleciones son frecuentes en determinadas poblaciones como la --SEA, --FIL y --THAI en el sudeste asiático y la --MED en el Mediterráneo, y otras solamente afectan a una familia o a pocas familias de la población mundial [6].

La deleción --SEA es la variante de  $\alpha^0$  talasemia más común en el sudeste asiático. Se produce una deleción de aproximadamente 20Kb que abarca a los genes  $\psi\alpha 2$ ,  $\psi\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$  y  $\theta$ , dejando intactos los genes  $\zeta$ . La deleción --MED es una de las más comunes en las poblaciones mediterráneas y produce la pérdida de los genes  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha 2$ ,  $\psi\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ .

Más raramente, existen  $\alpha^0$ -talasemias originadas por la eliminación del elemento regulador HS-40 dejando intactos los genes  $\alpha$  y  $\zeta$  [44]. (Figura 14). En este tipo se suprime la Región Control Locus (LCR) localizada en el extremo 5' entre 33 y 55Kb del *cluster*  $\alpha$  de globina, abarcando secuencias importantes en la expresión del *cluster*.



**Figura 14: Deleciones causantes de  $\alpha^0$ -talasemia.**

Extraída de: Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(1):13.A) Grandes deleciones que involucran a los dos genes  $\alpha$ . B) Deleciones del elemento regulador que dejan intactos los genes  $\alpha$ .

### B) $\alpha$ -Talasemia no deleción

La  $\alpha$ -talasemia no deleción es debida a mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones de una o más bases en los genes  $\alpha$  y ocasionan un defecto en la transcripción, traducción o en el procesamiento postraducional. La  $\alpha$ -talasemia no deleción fue descrita por primera vez en 1977. La mayoría ocurren dentro del dominio del gen  $\alpha_2$  sin que existan cambios en la expresión del gen  $\alpha_1$  de modo que en general ocasionan una reducción de la síntesis de cadena  $\alpha$  de globina superior a la ocasionada por las  $\alpha$ -talasemias deleción [44, 45].

La mayoría de las alteraciones moleculares encontradas son poco frecuentes y privativas de algunas familias, aunque existen algunas variantes que son más frecuentes en ciertas poblaciones como pueden ser la Hph [ $\alpha_2$  IVS-I 2-6 GAG GTG AGG>GAG G-- ---], la Nco [ $\alpha_2$  CD Iniciación ATG>ACG] y la T-Saudí [ $\alpha_2$  Señal PolyA AATAAA>AATAAG].

### **B.1. Mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm**

Las  $\alpha$  talasemias no deleción son originadas, entre otros casos, por mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm fundamentalmente mediante dos mecanismos diferentes: las mutaciones que interfieren con el *splicing* normal y las que afectan a la adecuada poliadenilación del ARNm. (Tabla I)[22, 44].

#### **B.1.a. Mutaciones que afectan al *splicing***

Son aquellas alteraciones moleculares en las cuales se ven afectadas las secuencias del sitio aceptor o donador del *splicing* y que originan una supresión completa de la producción de la cadena  $\alpha$  de globina a partir de ese gen ya que el ARNm no recibe el procesamiento adecuado y es altamente inestable [51].

También se recogen bajo este mecanismo las mutaciones que originan un nuevo sitio aceptor o donador de *splicing*, ya que serían responsables de ocasionar un *splicing* alternativo que sería erróneo.

Un ejemplo de alteración que origina una  $\alpha$  talasemia no deleción por este mecanismo sería la conocida como  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ . Se trata de una

deleción de cinco nucleótidos (TGAGG) situados en el extremo 5' del primer intrón (*Intervening Sequence-I*, IVS-I) e interfiere en el procesamiento normal a nivel del corte y empalme del ARNm procedente de  $\alpha_2$ . Esta mutación se reconoce *in vitro* al abolir el sitio de corte de la enzima de restricción HphI en el gen  $\alpha_2$ , de ahí su nombre. Esta alteración fue descrita por primera vez en un paciente italiano en 1981 [51].

### **B.1.b. Mutaciones en la señal Poly A**

La señal Poly A (AATAAA) está altamente conservada y es considerada esencial para el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma y para su estabilidad. Se ha demostrado que sustituciones de bases en esta secuencia son responsables de algunos síndromes talasémicos debidos a una alteración en la eficacia de la escisión en el PolyA del ARN transcrito alterando la producción de ARNm normal y generando una transcripción continua, la cual se extiende más allá de la región de terminación normal.

La  $\alpha^{\text{T-Saudi}}$  es un ejemplo de mutación en la cual se encuentra involucrado este mecanismo. Está causada por una sustitución puntual en el gen  $\alpha_2$ , AATAAAA>AATAAGG que impide la formación de ARNm normal y posiblemente también disminuya la expresión del gen  $\alpha_1$  [52].

**Tabla I: Resumen de las  $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm.**

MECANISMO	GEN	SECUENCIA AFECTADA	MUTACIÓN	ORIGEN	NOMBRE
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD22 (Sitio de <i>splicing</i> críptico)	C>T	Surinam	
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-I 1	G>T	Italia	
Frameshift (-5nt)	$\alpha_2$	IVS-I 2-6	GAG GTG AGG>GAG G-- ---	Mediterráneo	Hph I
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-I 5	G>A	Judíos Askenazi	
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-I 55	G>A	India	
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-I 116	A>G	Holanda	
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-II 2	T>A	Norte de Europa	
Mutación puntual	$\alpha_2$	IVS-II 142	G>A	Argentina	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 1	G>A	Tailandia	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 4	A>G	Irán	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 5	G>A	África	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 38	C>T	Irán	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 45	G>C		
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 116	A>G	Irán	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-I 117	G>A	India	
Mutación puntual	$\alpha_1$	IVS-II 148	A>G	Irán	
Mutación puntual	$\alpha_2$	SEÑAL POLY A	AATAAAA> AAT <u>G</u> AA	Mediterráneo	
Mutación puntual	$\alpha_2$	SEÑAL POLY A	AATAAAA> AATAA <u>G</u>	Mundo Árabe	T-Saudí
Mutación puntual	$\alpha_2$	SEÑAL POLY A	AATAAAA> AATAA <u>C</u>	Surinam	
Frameshift (-2nt)	$\alpha_2$	SEÑAL POLY A	AATAAAA> AATA--	India	
Frameshift (-16nt)	$\alpha_2$	SEÑAL POLY A	CCT TCC TGG TCT TTG AATAAAA> -- - - - - - ATAAA	Mundo Árabe	

Mutaciones conocidas hasta la actualidad, origen y nombre.

### B.2. Mutaciones que afectan a la traducción del ARNm

Los mecanismos moleculares por los cuales se altera la traducción del ARNm son muy variados, desde mutaciones puntuales, sin sentido hasta *frameshift* (alteración del marco de lectura). Todas ellas parecen originar cadenas inestables (Tabla II) [22, 44].

#### B.2.a. Mutaciones en el codón de iniciación

Este tipo de mutación elimina completamente la expresión del gen involucrado, ya que el ARNm no puede dar lugar a proteína al carecer de un codón de iniciación apropiado para que comience la traducción.

La primera vez que se describió una mutación en el codón de iniciación fue en el año 1984 por Pirastu *et al.*, los cuales observaron en un paciente Sardo con una enfermedad de la Hb H la mutación ATG>ACG en el gen  $\alpha_2$  y que abolía la función de este gen así como una diana para la enzima de restricción NcoI [53]. Posteriormente, en 1987 Nancy *et al.* refirieron la alteración ATG>GTG en el codón de iniciación del gen  $\alpha$  híbrido resultante de la delección  $-\alpha^{3,7}$  en 4 miembros de una familia canadiense de color, estando asociados en 2 de ellos a una  $\alpha^+$ -talasemia delección homocigota ( $-\alpha^{3,7}$ ) y originando una enfermedad de la Hb H. Además como en el caso anterior, se anulaba una diana para la enzima de restricción NcoI [54].

Pirastu *et al.* en el mismo año publican, esta vez en el gen  $\alpha_1$ , la alteración en el codon de iniciación ATG>GTG, que asociada a una  $\alpha^0$ -talasemia deleción produce enfermedad de la Hb H con un fenotipo más suave que el descrito en el gen  $\alpha_2$  [55]. Este hecho pone de manifiesto, una vez más, la mayor expresión que tiene el gen  $\alpha_2$  con respecto al gen  $\alpha_1$ .

Hasta el momento, la última mutación puntual descrita en el codon de iniciación, fue publicada por Zandian *et al.* en el año 2008. Observaron la sustitución ATG>AGG en el gen  $\alpha_2$  en dos individuos consanguíneos iraníes dentro de un estudio enmarcado en un programa nacional de *screening* para talasemias [56].

El primer caso de deleción de un nucleótido (T) en el codon de iniciación ( $\alpha_2$  ATG>A-G) fue en el gen  $\alpha_2$  y en un caso de enfermedad de la Hb H. Waye *et al.* en 1997, descubrieron esta mutación en una niña canadiense de origen vietnamita [57].

Todos estos hallazgos identificados en el codon de iniciación, desvelan el papel tan importante que éste desempeña en la traducción, ya que en eucariotas superiores el codon ATG es el único triplete funcional como codon de iniciación [55].



**B.2.b. Mutaciones en el codon de terminación**

Están asociadas a una severa reducción de la expresión del gen  $\alpha_2$  y con la presencia de pequeñas cantidades de hemoglobina patológica. Esto es debido a que el codon de *stop* es sustituido por un aminoácido y la cadena peptídica resultante se alarga en 31 nuevos aminoácidos hasta un total de 172, lo cual vuelve a la globina altamente inestable.

La primera variante de este tipo fue publicada en 1971 por Clegg *et al.*, denominándola Hb Constant Spring ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Gln; HBA2:c.427T>C). En esta hemoglobina el codon de *stop* es sustituido por una glutamina (Gln). Esta variante fue encontrada en una familia china, procedente de Jamaica, con enfermedad de la Hb H. Esta mutación es muy frecuente en el sudeste asiático [58].

La segunda variante en ser descrita fue la Hb Icaria ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Lys; HBA2:c.427T>A) En este caso el aminoácido 142 corresponde a una lisina (Lys). Fue observada en familias griegas yugoslavas y macedonias [59].

La siguiente hemoglobina de cadena alargada es la Hb Koya Dora ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Ser; HBA2:c.428A>C), en donde el residuo 142 es una serina (Ser). Ha sido establecida en el 10% de los miembros de la tribu hindú Koya Dora [60].

La hemoglobina que en el codon 142 es codificada por un residuo de ácido glutámico (Glu) es referida como Hb Seal Rock ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Glu; HBA2:c.427T>G). Fue notificada por primera vez, en una mujer afroamericana joven y en su hija de 2 años [61]. La quinta alteración en el codon de terminación constituye la Hb Paksé ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Tyr; HBA2:c.429A>T), encontrada en una niña procedente de Laos [62].

Un hallazgo interesante lo constituye la Hb Zurich-Altstetten ( $\alpha_2$  CD142 Stop>His; HBA2:c.[427T>C;429A>T]), donde el aminoácido 142 es una histidina (His) y parece ser un 2º evento de mutación sobre un alelo responsable de la Hb Constant Spring. Esta variante fue diagnosticada en un residente suizo originario de Tailandia [22]. Recientemente ha sido publicada una séptima variante, denominada Hb Kinshasa ( $\alpha_2$  CD142 Stop>Leu; HBA2:c.428A>T). En este caso el codon *stop* es remplazado por un triplete correspondiente a leucina (Leu) la cual fue identificada en un joven congoleño [22].

Todo esto demuestra la importancia del codon de terminación en el proceso de traducción. Se ha comprobado que individuos homocigotos para este tipo de alteraciones muestran un fenotipo compatible con una leve enfermedad de la Hb H.

### **B.2.c. Mutaciones de tipo *frameshift***

Son alteraciones que se caracterizan por modificar el marco de lectura de manera que la traducción tiene una terminación prematura, ya que generalmente a 50-60pb de donde se produce la inserción o delección de nucleótidos se origina un nuevo codon de *stop*. Actualmente existen 22 eventos de inserción o delección de nucleótidos que generan un fenómeno de *frameshift* y que cursan con  $\alpha$ -talasemia [22]. (Tabla II).

### **B.2.d. Mutaciones sin sentido**

Las mutaciones sin sentido son aquellas que generan la sustitución de un triplete codificante para un aminoácido por un codon de *stop* y por lo tanto se detiene la síntesis proteica prematuramente. Hasta la actualidad se han documentado 9 mutaciones sin sentido, 6 que afectan al gen  $\alpha_2$  y 3 al gen  $\alpha_1$  [22] (Tabla II).

**Tabla II: Resumen de las  $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan a la traducción del ARNm.**

MECANISMO	GEN	SECUENCIA AFECTADA	MUTACIÓN	ORIGEN	NOMBRE
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Iniciación	ATG> <u>A</u> CG	Italia	NcoI
<b>Mutación puntual</b>	$-\alpha^{3,7}$	CD Iniciación	ATG> <u>G</u> TG	Afro-Americano	NcoI
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_1$	CD Iniciación	ATG> <u>G</u> TG	Cerdeña	
<b>Frameshift (-1nt)</b>	$\alpha_2$	CD Iniciación	ATG>A-G	Vietnam	
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Iniciación	ATG> <u>A</u> GG	Irán	
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>C</u> AA	Sudeste Asiático	Hb Constant Spring
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>A</u> AA	Grecia y Balcanes	Hb Icaria
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>T</u> CA	India	Hb Koya Dora
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>G</u> AA	Afro-Americano	Hb Seal Rock
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>TAT</u>	Sudeste Asiático	Hb Paksé
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>CAT</u>	Tailandia	Hb Zurich-Altstetten
<b>Mutación puntual</b>	$\alpha_2$	CD Terminación	TAA> <u>T</u> TA	Congo	Hb Kinshasa
<b>Frameshift (+1nt)</b>	$\alpha_2$	CD22	GGC> <u>T</u> GGC		
<b>Frameshift (+1nt)</b>	$\alpha_2$	CD52	TCT> <u>G</u> TCT		
<b>Frameshift (+2nt)</b>	$\alpha_2$	CD115	GCC> <u>CC</u> GCC	Grecia	
<b>Frameshift (+1nt)</b>	$\alpha_1$	CD20	CAC>CA <u>T</u> C	Francia	
<b>Frameshift (+1nt)</b>	$\alpha_1$	CD44	CCG>CC <u>C</u> G	Irán	
<b>Frameshift (+1nt)</b>	$\alpha_1$	CD132	GTG> <u>T</u> GTG	Tailandia	Hb Pak Num Po
<b>Frameshift (-1nt)</b>	$\alpha_2$	CD8	ACC>AC-		
<b>Frameshift (-1nt)</b>	$\alpha_2$	CD18	GGC>G-C	Irán	
<b>Frameshift (-1nt)</b>	$\alpha_2$	CD19	GCG>GC-	Iraq	
<b>Frameshift (-2nt)</b>	$-\alpha^{3,7}$	CD31	AGG>--G	Afro-Americano	

Mutaciones conocidas hasta la actualidad, origen y nombre.

**Tabla II: Continuación.**

MECANISMO	GEN	SECUENCIA AFECTADA	MUTACIÓN	ORIGEN	NOMBRE
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_2$	CD37	CCC>-CC		
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_2$	CD43	TTC>-TC	África	
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_2$	CD47	GAC>G-C		
<i>Frameshift (-2nt)</i>	$\alpha_2$	CD49	AGC>A--	Oriente Medio	
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_2$	CD107	GTG>G-G	Sudán	Hb Lynwood
<i>Frameshift (-11nt)</i>	$\alpha_2$	CD116-119	GAG TTC ACC CCT>--- --- --- -T	Paquistán	
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_2$	CD129	CTG>-TG		Hb Hamilton Hill
<i>Frameshift (-13nt)</i>	$\alpha_1$	CD51-55	GGC TCT GCC CAG GTT>G-- --- --- --- -T	España	
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_1$	CD62	GTG>GT-	África	
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_1$	CD108	ACC>AC-	Judíos	
<i>Frameshift (-13nt)</i>	$\alpha_1$	CD110-114	GCC GCC CAC CTC CCC>GC- --- --- --- ---		
<i>Frameshift (-1nt)</i>	$\alpha_1$	CD131	TCT>TC-	Marruecos	Hb Fez
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD7	AAG> <u>T</u> AG	Irán	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD14	TGG>TG <u>A</u>	Sudeste Asiático	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD23	GAG> <u>T</u> AG	Túnez	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD24	TAT>TAG <u>G</u>	Afro-Americano	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD90	AAG> <u>T</u> AG	Oriente Medio	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_2$	CD116	GAG> <u>T</u> AG	Afro-Americano	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_1$	CD14	TGG>T <u>A</u> G	Irán	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_1$	CD23	GAG> <u>T</u> AG	Italia	
<b>Mutación sin sentido</b>	$\alpha_1$	CD99	AAG> <u>T</u> AG	Irán	

Mutaciones conocidas hasta la actualidad, origen y nombre.

### **B.3. Mutaciones que afectan a la estabilidad postraducional**

Son alteraciones a nivel de las zonas codificantes del gen, es decir, de los exones pero que generan una cadena anómala que es altamente inestable precipitando prematuramente en el eritrocito. Por este mecanismo se generan las denominadas hemoglobinas hiperinestables que a pesar de ser hemoglobinopatías estructurales y presentar hemólisis periférica, se comportan como talasemias y por tanto se asocian a una eritropoyesis ineficaz [63].

La detección de estas variantes puede ser extremadamente difícil ya que muchas son bastante complicadas de revelar por técnicas electroforéticas o cromatográficas [31, 63].

#### **B.3.a. Variantes de cadena $\alpha$ inestables debido a mutaciones puntuales**

Las mutaciones que afectan a un único nucleótido son mayoritariamente las que generan variantes de cadena  $\alpha$  inestables. Estas alteraciones originan un cambio de aminoácido que involucra a una región especialmente importante para mantener la estabilidad de la proteína, por ello las mutaciones, aunque están distribuidas a lo largo de todo el gen, se concentran en mayor medida en los aminoácidos codificados por el tercer exon. Estas alteraciones son las denominadas hemoglobinopatías inestables como ya se ha comentado en el punto III.10.2.

Algunos ejemplos serían la Hb Agrinio [ $\alpha_2$  CD29(B10)Leu>Pro], la Hb Tunis-Bizerte [ $\alpha_1$  CD129(H12)Leu>Pro], la Hb Plasencia

[ $\alpha_2$  CD125(H8)Leu>Arg], la Hb Iberia [ $\alpha_2$  CD104(G11)Cys>Arg] [35], o la Hb Groene Hart [ $\alpha_1$  CD119(H2)Pro>Ser]. Un resumen de las alteraciones de este tipo reportadas hasta la actualidad queda recogido en la Tabla III [22, 44].

### **B.3.b. Variantes de cadena $\alpha$ inestables debido a pequeñas delecciones o inserciones**

Casi la totalidad de las hemoglobinopatías son el resultado de una mutación puntual, a nivel de un único nucleótido, mientras que tan sólo unas pocas se originan a consecuencia de la delección o adición de varias bases. Un ejemplo lo constituye la Hb Pak Num Po [ $\alpha_1$  132(+T); secuencia C-terminal modificada: (132)Cys-Glu-His-Arg-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-Leu-Gly-Gly-His-Ala-Ser-Cys-Pro-Leu-Gly-Leu-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Leu-Pro-Ala-Pro-Val-Pro-Pro-Trp-Ser-Leu-Asn-Lys-(175)Val-COOH]. Estas variantes posiblemente por un mecanismo de oxidación de la cadena proteica precipiten dañando la membrana del eritrocito y ocasionando una anemia hemolítica [37, 38] (Tabla III).

**Tabla III: Resumen de las  $\alpha$ -talasemias no delección, debidas a mutaciones que afectan a la estabilidad postraducional.**

MECANISMO	GEN	SECUENCIA AFECTADA	MUTACIÓN	ORIGEN	NOMBRE
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD21	G>T (Ala>Ser)	Holanda	Hb Zoetermeer
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD29	T>C (Leu>Pro)	Grecia	Hb Agrinio
Frameshift (-3nt)	$\alpha_2$	CD30	GAG>---	Caucásicos	
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD31	G>A (Arg>Lys)	China	
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD32	G>A (Met>Ile)	Surinam	Hb Amsterdam
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD33	T>C (Phe>Ser)	Francia	Hb Chartres
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD35	T>C (Ser>Pro)	Portugal	Hb Evora
Mutación puntual	$\alpha$	CD59	G>A (Gly>Asp)	Turquía	Hb Adana
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD59	G>C (Gly>Arg)	Suiza	Hb Zurich-Albisrieden
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD66	T>C (Leu>Pro)	Irlanda, Escocia	Hb Dartmouth
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD93	T>G (Val>Gly)	Italia	Hb Bronte
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD103	A>T (His>Leu)	Turquía	Hb Bronovo
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD104	G>A (Cys>Tyr)	Francia, Paquistán	Hb Sallanches
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD104	T>C (Cys>Arg)	España	Hb Iberia
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD108	C>A (Thr>Asn)	Surinam	Hb Bleuland
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD109	T>G (Leu>Arg)	Tailandia	Hb Suan Dok
Frameshift (-12nt)	$\alpha_2$	CD112-116	CAC CTC CCC GCC GAG > CA- -- - - - - -G	España	Hb Lleida
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD125	T>G (Leu>Arg)	España	Hb Plasencia
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD125	T>C (Leu>Pro)	China	Hb Quong Sze
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD125	T>A (Leu>Gln)	Turquía	Hb Westeinde

Mutaciones conocidas hasta la actualidad, origen y nombre.



**Tabla III. Continuación.**

MECANISMO	GEN	SECUENCIA AFECTADA	MUTACIÓN	ORIGEN	NOMBRE
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD129	T>C (Leu>Pro)	Holanda	Hb Utrecht
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD130	G>C (Ala>Pro)	India	Hb Sun Prairie
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD131	T>C (Ser>Pro)	Francia	Hb Questembert
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD132	T>G (Val>Gly)	Francia	Hb Caen
Mutación puntual	$\alpha_2$	CD136	T>C (Leu>Pro)	Caucásico	Hb Bibba
Mutación puntual	$\alpha$	CD14	T>G (Trp>Arg)	África	Hb Evanston
Frameshift (-3nt)	$\alpha_1$	CD37	CCC>---	Creta	Hb Heraklion
Frameshift (-3nt)	$\alpha_1$	CD60 o 61	AAG>---	España	Hb Clinic
Frameshift (-3nt)	$\alpha_1$	CD62	GTG>---	Grecia	Hb Aghia Sophia
Mutación puntual	$\alpha_1$	CD104	T>A (Cys>Ser)	Surinam	Hb Oegstgeest
Mutación puntual	$\alpha_1$	CD106	T>C (Leu>Pro)	Francia	Hb Charlieu
Mutación puntual	$\alpha$	CD110	C>A (Ala>Asp)	Judíos Iraquíes	Hb Petah Tikva
Mutación puntual	$\alpha_1$	CD119	C>T (Pro>Ser)	Marruecos	Hb Groene Hart o Bernalda
Mutación puntual	$\alpha_1$	CD125	T>C (Leu>Pro)	Caucásico	Hb Quong Sze II
Mutación puntual	$\alpha_1$	CD129	T>C (Leu>Pro)	Túnez	Hb Tunis-Bizerte

Mutaciones conocidas hasta la actualidad, origen y nombre.

### C) $\alpha$ -Talasemia por asociación de formas delección y no delección

Este tipo de asociaciones, serían las responsables mayoritarias de las formas más severas de la enfermedad (enfermedad de la Hb H). El genotipo más frecuente se debe a la heredabilidad de una  $\alpha^0$ -talasemia delección junto con una mutación puntual en el cromosoma homólogo ( $--/\alpha^T\alpha$ ). Teniendo en cuenta que la  $\alpha$ -talasemia es una patología muy frecuente en algunas zonas del mundo y que existe una gran variedad de mutaciones, tanto para la delección como la no delección, la probabilidad de que este tipo

de uniones se produzcan no es infrecuente. Por tanto, sería conveniente caracterizar molecularmente las  $\alpha$ -talasemias, para dar un acertado consejo genético y evitar las formas más graves de la enfermedad [2].

#### **D) $\alpha$ -Talasemia adquirida (ATSMD)**

Es una forma poco frecuente de aparición de la enfermedad de la Hb H, que acompaña a algunas alteraciones hematológicas como los síndromes mielodisplásicos que han progresado hacia formas leucémicas. Sucede con más frecuencia en el sexo masculino, con una proporción hombre:mujer mayor que 6:1, y aparece incluso antes de que se presenten las alteraciones hematológicas de la enfermedad de base. Hasta la fecha se han identificado unos 80 casos y como curiosidad comentar que la mayoría de pacientes afectados tienen antepasados del norte de Europa. Se han descrito algunos pacientes de Asia y del área mediterránea [64].

En estos enfermos, se produce un déficit muy importante de la síntesis de la cadena  $\alpha$  de globina con cifras de Hb H en torno al 18%, pudiendo llegar incluso hasta el 80-90%. Los análisis moleculares de estos pacientes demuestran que no existen reordenamientos en el *cluster*  $\alpha$  de globina pero sin embargo, la cantidad de ARNm está reducida por lo que se cree que el déficit se debe a un problema de la transcripción de los genes  $\alpha$  provocada por una regulación negativa asociada a mutaciones somáticas adquiridas en el gen *ATRX* (Xq21.1). Existen también evidencias de que deleciones adquiridas del cromosoma 16 pueden ser causantes del síndrome [2, 64].

Los hallazgos hematológicos típicos muestran glóbulos rojos microcíticos hipocrómicos y una anisopoiquilocitosis importante, y la presencia de inclusiones de Hb H en una proporción de eritrocitos que varía dependiendo de los pacientes. El diagnóstico diferencial incluye otras causas de anemia, citopenia o microcitosis. Es

importante descartar una forma hereditaria de alfa talasemia mediante análisis molecular del locus HBA [64].

### **E) $\alpha$ -Talasemia asociada a retraso mental**

En 1981 se describieron tres familias del norte de Europa en las que existía un importante retraso mental asociado a una enfermedad de la Hb H, pudiendo distinguirse dos grupos según sus síndromes [2].

El primero se denomina Síndrome Alfa-Talasemia con retraso mental ligado al X (ATR-X), se asocia en varones a un profundo retraso en el desarrollo, dimorfismo facial, anomalías genitales (80% de los niños) y alfa talasemia (no está presente siempre). Generalmente las portadoras femeninas son física e intelectualmente normales. Hasta ahora, se han publicado 168 casos. Este síndrome es recesivo ligado al cromosoma X y es producto de las mutaciones en el gen *ATRX*. Este gen codifica una proteína extensamente expresada, la ATRX. Las mutaciones en *ATRX* causan cambios diversos en el patrón de metilación del ADN, en los loci heterocromáticos, pero todavía se desconoce si son responsables del fenotipo clínico [65].

El segundo, es el denominado Síndrome de alfa talasemia - déficit intelectual ligado al cromosoma 16 (ATR-16). Es una enfermedad congénita y se caracteriza por microcitosis, hipocromía, niveles normales de hemoglobina (Hb) o anemia leve, asociación a anomalías en el desarrollo y a discapacidad intelectual entre leve y severa. Hasta la fecha, se han descrito unos 20 casos. Se han referido anomalías genitales en varones (hipospadias y criptorquidia). La ATR-16 se debe a grandes deleciones (1-2Mb) en la banda cromosómica 16p13.3 que eliminan los genes de la alfa globina (*HBA1* and *HBA2*), y muchos otros genes flanqueantes. Los genes responsables del

déficit intelectual y de otras anomalías en el desarrollo no han sido identificados. Todos los casos se deben a deleciones *de novo* o a una segregación no equilibrada de translocaciones parenterales. El consejo genético es posible cuando se sabe que los padres son portadores de la translocación cromosómica [66].

#### **III.11.1.4 Prevalencia de las $\alpha$ -Talasemias en población española**

En España los estudios epidemiológicos, aunque escasos y esporádicos, han evidenciado una elevada incidencia de las  $\alpha$ -talasemias, alcanzando un umbral del 4,79% aunque con una distribución geográfica irregular y marcada heterogeneidad fenotípica. Este porcentaje es muy similar al encontrado en otros países de la cuenca Mediterránea [67].

Según un estudio del grupo de la Dra. Villegas en el que se analizaron 517 casos de  $\alpha$ -talasemia, se observó que un 92,3% estaban producidas por deleciones mientras que tan sólo el 7,7% se debían a mutaciones puntuales o a pequeñas deleciones o inserciones. En este mismo estudio la alteración molecular causante de  $\alpha$ -talasemia no deleción que apareció con una mayor incidencia fue la Hph seguida de la Nco [67].



#### **IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Las  $\alpha$ -talasemias y las hemoglobinopatías estructurales son unas de las alteraciones monogénicas más frecuentes a nivel mundial. En España, los estudios epidemiológicos en la actualidad no son muy abundantes.

Debido a ello y aprovechando que el grupo del Hospital Clínico San Carlos es referente a nivel nacional para el estudio de hemoglobinopatías y talasemias y que por ello recibe un elevado volumen de muestras se ha establecido el presente estudio.

Nos hemos propuesto profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares potencialmente responsables de la heterogeneidad observada en el comportamiento clínico y biológico de los pacientes con  $\alpha$ -talasemia. Los objetivos serían los siguientes:

1. Analizar la distribución de variables de tipo demográfico tales como el sexo, la edad o la etnia de los pacientes con  $\alpha$ -talasemia y/o hemoglobinopatías estructurales en nuestro medio.
2. Comprobar la incidencia de  $\alpha$ -talasemia no deleción dentro de los casos de  $\alpha$ -talasemia para conocer si se ajusta a lo descrito en la literatura para otras poblaciones.
3. Determinar la heterogeneidad molecular de la  $\alpha$ -talasemia y de las hemoglobinopatías estructurales en nuestro entorno.
4. Establecer diferencias hematimétricas entre los diferentes diagnósticos de  $\alpha$ -talasemia a nivel genotípico, haciendo un estudio más exhaustivo de la  $\alpha$ -talasemia no deleción.
5. Establecer un perfil bioquímico de separación tanto por HPLC de intercambio iónico como por electroforesis capilar para las diferentes hemoglobinopatías estructurales y analizar las diferencias tanto en cuantía como en lugar de separación.



6. Pronosticar *in silico* cuando una hemoglobinopatía será potencialmente dañina y cuando será silente para las nuevas hemoglobinopatías descritas en este trabajo y comprobar cuál de los métodos es más útil y fiable.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## V.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Desde enero de 2009 hasta diciembre de 2014 se han estudiado 1.623 individuos procedentes de diferentes regiones españolas. Entre los sujetos de estudio se encuentran tanto población nativa como inmigrante. Se trata de un estudio ambispectivo.

1.470 individuos son pacientes con anemia microcítica e hipocroma y cumplen los siguientes criterios de inclusión:

- Volumen Corpuscular Medio (VCM) < 80 fL.
- Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) < 27pg.
- Hb A<sub>2</sub> y Hb F normales, sin hemólisis y sin ferropenia.

176 sujetos presentaron un pico de hemoglobina anómalo bien por cromatografía de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico, bien por electroforesis capilar de hemoglobinas, o por ambas. En esos casos se procedió a filiar la hemoglobinopatía estructural. Veinte y tres casos fueron englobados simultáneamente en el estudio de alfa talasemias y de hemoglobinopatías estructurales.

El diagnóstico de  $\alpha$ -talasemia en el laboratorio precisó de los siguientes estudios:

- Estudio hemocitométrico convencional con morfología de la serie roja.
- Recuento de reticulocitos.
- Determinación de la Hb A<sub>2</sub> y Hb F por HPLC de intercambio iónico.
- Cuantificación de los cuerpos de inclusión de Hb H.

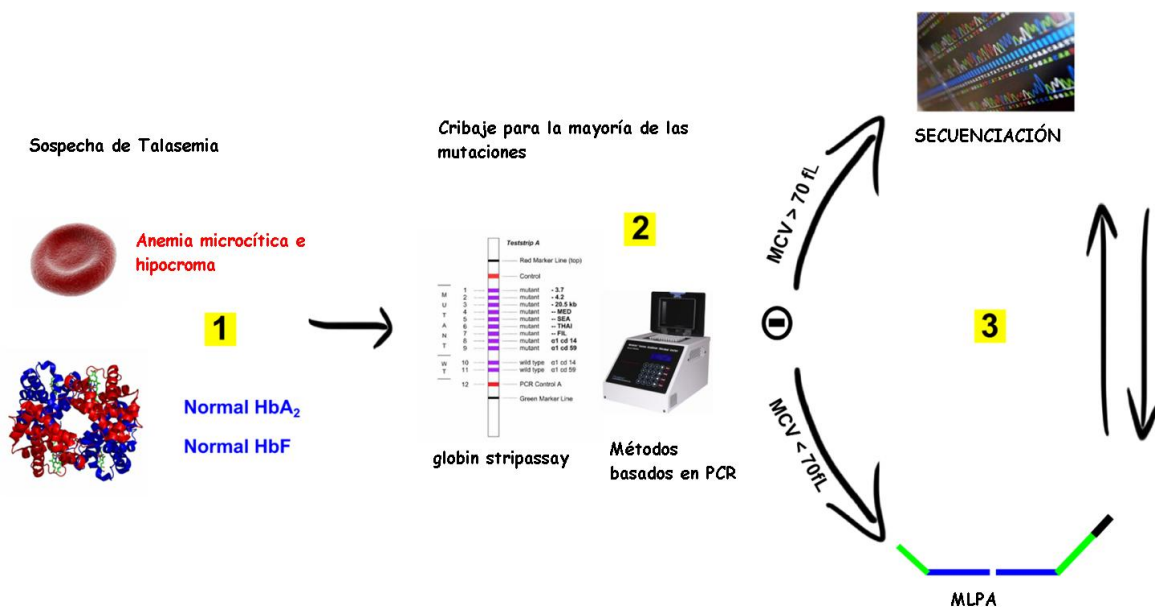
Para el diagnóstico de las hemoglobinopatías estructurales:

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Electroforesis capilar de hemoglobinas.
- HPLC de fase reversa o HPLC de cadenas de globina.

Por otro lado, el diagnóstico molecular se ha realizado mediante el siguiente algoritmo (Figura 15):

- Extracción automática del ADN genómico contenido en los núcleos de los leucocitos de sangre periférica.
- Descartar grandes deleciones y las mutaciones puntuales más frecuentes empleando el método del  $\alpha$ -globin StripAssay<sup>®</sup>.
- Descartar otras grandes deleciones mediante *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).



**Figura 15: Algoritmo para el diagnóstico molecular de  $\alpha$ -talasemia.**

1) Sospecha clínica de talasemia en base a parámetros hematológicos y bioquímicos. 2) Cribaje de las mutaciones causantes de  $\alpha$ -talasemia más frecuentes. 3) Búsqueda de otras alteraciones.

Si no se ha identificado la alteración responsable de la mutación se procede al estudio gradual de los genes alfa, empezando por el gen  $\alpha_2$ . En los pacientes que no

presentaron ninguna alteración genética en  $\alpha_2$ , se les realizó un estudio similar para el gen  $\alpha_1$ . Este estudio se lleva a cabo mediante secuenciación automática según el método de Sanger.

## **V.2 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

### **V.2.1 RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras fueron obtenidas por punción venosa. Se extrajeron 15mL de sangre recogida en 3 tubos con EDTA-K<sub>3</sub> (sal anhidra del ácido Etilen-Diamino-Tetra-Acético) (*Vacutainer B-D*<sup>®</sup> EDTA-K<sub>3</sub>) mezclándose suavemente por inversión para evitar que la sangre se coagule. También se obtuvo un tubo seco o con gelosa de 10mL para la obtención de suero.

El primer tubo de EDTA se utilizó para la realización de los estudios hemocitométricos, de morfología eritrocitaria, recuento reticulocitario y cuerpos de inclusión. El segundo tubo fue empleado para los métodos bioquímicos de separación de hemoglobinas y de cadenas de globina (HPLC y electroforesis de hemoglobinas) y el tercero en la extracción de ADN genómico para los estudios de biología molecular.

Finalmente, el tubo seco fue centrifugado para la obtención de suero que se conservó en nevera a 4°C hasta su procesamiento, con el objetivo de analizar la sideremia, la transferrina y la ferritina y así descartar ferropenia.

### **V.2.2 ESTUDIOS HEMOCITOMÉTRICOS**

Fueron determinados por impedancia eléctrica (principio Coulter), en un contador de células hematológicas automatizado (Coulter LH750 Analyzer; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), los siguientes parámetros:

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recuento de hematíes (RBC), expresado en c.s  $\times 10^{12}/L$ .
2. Valor del hematocrito (Hto), expresado en mL de hematíes/100mL de sangre total (%).
3. Tasa de hemoglobina que se expresó en g/dL.
4. Volumen Corpuscular Medio (VCM), expresado en femtolitros (fL).
5. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) en picogramos (pg).
6. Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), expresada en %.
7. Ancho de distribución eritrocitario o Índice de anisocitosis (RDW), expresado en %.

### V.2.3 MORFOLOGÍA ERITROCITARIA

La observación de un frotis sanguíneo es de vital importancia en hematología, ya que el diagnóstico de muchas enfermedades hematológicas puede realizarse con sólo observar las características morfológicas de las células sanguíneas, o al menos ser una herramienta de gran calidad para orientar en el diagnóstico. Con respecto a los hematíes, se debe tener en cuenta el tamaño, forma y contenido de los mismos.

### REACTIVOS

- Agua destilada.
- Colorante de Wright o de Eosina-Azul de Metileno (Analema).

## PROCEDIMIENTO

La sangre para realizar las extensiones no debe llevar más de una hora anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>. Se deposita una gota de sangre sobre un portaobjetos, extendiéndose con otro, de manera que quede una superficie fina. Seguidamente se deja secar al aire.

Posteriormente, se añaden 2,5mL de colorante de Wright cubriendo toda la preparación y se deja que la tinción se lleve a cabo durante 13 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden lentamente con una pipeta, 2,5mL de agua destilada para cubrir toda la preparación, hasta que aparezcan unos reflejos metálicos sobre el agua y se deja otros 13 minutos para posteriormente lavar con abundante agua destilada y así eliminar los restos del colorante. Finalmente, secar al aire en posición vertical y cubrir con bálsamo.

### V.2.4 RECUENTO DE RETICULOCITOS

El recuento de reticulocitos se llevó a cabo siguiendo el método Dacie, mediante tinción con Azul Cresil Brillante, expresándose en tanto por ciento (%) de hematíes.

## REACTIVOS

- Suero salino fisiológico (NaCl 0,9g/dL) (Grifols, S.A, Barcelona, España).
- Colorante Azul de Cresil Brillante (Merck, Darmstadt, Alemania).

## PROCEDIMIENTO Y CÁLCULOS

Se añaden 200μL de colorante Azul de Cresil Brillante a 200μL de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>, mezclándolo con cuidado y dejando en incubación en un baño a 37°C durante 15 minutos. A continuación se hacen extensiones para contar 1.000



## MATERIAL Y MÉTODOS

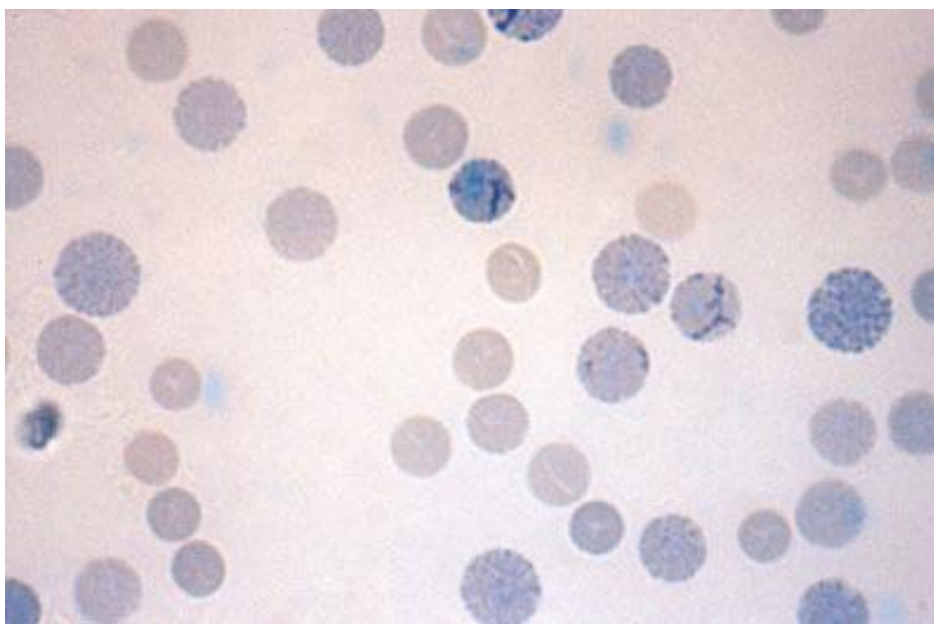
hematíes, anotando el número de reticulocitos que aparecen entre ellos, expresando el número en tanto por ciento (%).

Para calcular el número absoluto de reticulocitos, se obtiene multiplicando el porcentaje de reticulocitos por el recuento de hematíes expresado en  $\times 10^9/L$ .

Actualmente el analizador hematológico realiza la determinación de reticulocitos con tecnología de impedancia, radiofrecuencia y dispersión de rayo láser.

### V. 2.5 OBSERVACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Los cuerpos de inclusión son partículas de hemoglobina desnaturalizada o precipitada, que se observan en el borde de los hematíes en algunos déficits enzimáticos, en los síndromes  $\alpha$  talasémicos (Hb H) y en los casos de hemoglobinopatías inestables (Figura 16).



**Figura 16: Cuerpos de inclusión al microscopio y teñidos con azul de cresil brillante.**

## REACTIVOS

- Suero salino fisiológico (NaCl 0,9g/dL) (Grifols, S.A, Barcelona, España).
- Colorante Azul de Cresil Brillante (Merck, Darmstadt, Alemania).

## PROCEDIMIENTO Y CÁLCULOS

Se añaden 200µL de colorante Azul de Cresil Brillante a 200µL de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>, mezclándolo con cuidado y dejando en incubación en un baño a 37°C durante 3 horas. A continuación, se hacen extensiones a la hora, 2 horas y 3 horas de incubación y se dejan secar al aire.

Se contabilizan un mínimo de 10.000 hematíes al microscopio con objetivo de inmersión y se expresan el número de hematíes con cuerpos de inclusión referidos a 10.000 eritrocitos.

### V.2.6 CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA A<sub>2</sub> Y HB F

La determinación y cuantificación de la Hb A<sub>2</sub> y de la Hb F se efectuó por HPLC de intercambio iónico usando un gradiente salino (VARIANT™ II β-thalassemia Short Program; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## REACTIVOS

- VARIANT™ II β-thalassemia Short Program (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Ref. 270-2154).

## PROCEDIMIENTO

Las muestras de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>, son automáticamente mezcladas y diluidas por el analizador e inyectadas en la columna analítica. Mediante

unas bombas duales se obtiene un gradiente de *buffer* de fuerza iónica creciente en el cartucho, donde la Hb A<sub>2</sub> y la Hb F son separadas en base a sus interacciones iónicas con el material de la columna.

Posteriormente, la Hb A<sub>2</sub> y la Hb F separadas pasan a través de la célula de flujo del fotómetro de filtro, donde son medidos los cambios en la absorbancia a 415nm. Un filtro adicional a 690nm corrige la absorbancia debida al ruido. Las pequeñas diferencias que puedan existir en la eficiencia de separación entre los distintos cartuchos de análisis son corregidas con un calibrador de Hb A<sub>2</sub> y Hb F.

Seguidamente, el *software* procesa el dato bruto de cada análisis y genera un informe y un cromatograma por muestra.

### **V.2.7 CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE INTERCAMBIO IÓNICO**

La cromatografía de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico además de ser útil para la determinación y cuantificación de Hb A<sub>2</sub> y Hb F, también permite separar hemoglobinas anómalas como la Hb S, la Hb C y otras que son menos frecuentes.

Por esta metodología se obtiene el tiempo de retención (RT) en minutos de la variante de hemoglobina y se cuantifica su porcentaje referido al sumatorio de todas las distintas fracciones de hemoglobina.

### **V.2.8 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA DE HEMOGLOBINAS**

La electroforesis permite detectar las hemoglobinas patológicas mediante un análisis cualitativo y cuantitativo de las fracciones de la hemoglobina. Las mutaciones responsables de las variantes de hemoglobina provocan un cambio de aminoácido que modifica la carga eléctrica de la hemoglobina.

La electroforesis capilar de zona (Sebia<sup>®</sup>; Norcross, GA, USA) es una técnica que permite la separación de proteínas en solución según la relación masa/carga. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (menos de 50µm de diámetro), de ahí que reciba el nombre de capilar. Las proteínas son moléculas anfotéricas, por lo que su carga eléctrica depende del pH de la solución.

Anteriormente a la utilización de este procedimiento, era necesaria la utilización de diversas técnicas electroforéticas para poder caracterizar las variantes de hemoglobina. Entre estas técnicas se encuentran la electroforesis a pH básico en acetato de celulosa, la electroforesis a pH ácido en gel de agar citrato y el isoelectroenfoque realizado en geles de poliacrilamida.

La mayor resolución de la electroforesis capilar de zona permite separar las variantes más comunes en medio alcalino. Todas las variantes principales (Hb S, Hb C, Hb D, Hb E) se separan en zonas distintas.

Dentro del capilar de separación se encuentra la disolución que contiene los analitos o moléculas a separar y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. El interior se encuentra formado por grupos silanol (Si-OH), los cuales al ser desprotonados (Si-O), elevan considerablemente el pH y favorecen la presencia de analitos específicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Como se ha comentado, la separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas. Para que esto sea posible es necesario aplicar una diferencia de potencial (de 100 a 500V/cm) entre los extremos del capilar (movilidad electroforética: las moléculas catiónicas hacia el polo negativo y las aniónicas hacia el polo positivo) y que se vayan separando entre sí.

Además, existe dentro del capilar otro fenómeno denominado flujo electroosmótico generado por los grupos silanol de la superficie interna del capilar. El flujo electroosmótico es el mismo dentro de todo el capilar y afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos. Así la separación se verá afectada por el flujo electroosmótico y por la movilidad electroforética de cada una de las moléculas.

## REACTIVOS

- Sebia®; Norcross, GA, USA (Ref. 2207).

## PROCEDIMIENTO

Las muestras de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub> son automáticamente mezcladas y hemolizadas por el analizador que posteriormente establece una diferencia de potencial en el área de los capilares y comienza la separación de las fracciones de hemoglobina presentes en la muestra en base a su diferente carga a pH básico.

Finalmente, a las hemoglobinas separadas se les mide la absorbancia a 415nm y seguidamente, el *software* procesa el dato bruto de cada análisis y genera un informe y un electroferograma por muestra.

### **V.2.9 CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE FASE REVERSA**

La cromatografía de alta resolución (HPLC) de fase reversa se utiliza para la separación de las cadenas de la hemoglobina, es decir, para observar las distintas fracciones proteicas de la hemoglobina. En las hemoglobinopatías estructurales es muy importante conocer cuál es la cadena de globina afectada para así dirigir el estudio molecular posterior. Por HPLC de fase reversa podemos distinguir las cadenas  $\beta$ , las cadenas  $\alpha$ , y las cadenas patológicas tanto de  $\alpha$  como de  $\beta$  así como las  $\gamma$ .

#### **EQUIPO**

- 2 bombas de flujo constante N° LC-6-A (Shimadzu, Tokio, Japón).
- Espectrofotómetro de longitud de onda variable (SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric detector) (Shimadzu, Tokio, Japón).
- Unidad integradora (System Controller SCL-6B) (Shimadzu, Tokio, Japón).
- Unidad registradora (C-R6A Chromatopac) (Shimadzu, Tokio, Japón).

#### **COLUMNA**

- Constituye la fase estacionaria. C4 Vydac large-pore (330 Å), 4.6 x 250nm. Cat N° 214TP54, from the Separations Group. PO Box 867, Hesperia, CA 92345, USA.

#### **REACTIVOS**

- Agua desionizada calidad HPLC (<15mega $\Omega$  de resistencia).
- Ácido Trifluoroacético (TFA), N°91699 Fluka Biochemika.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Acetonitrilo (Ac 0329 gradiente 240/far UV, HPLC grade, Laboratorio Scharlau, Barcelona, España).

### FASE MÓVIL

Disolvente A: mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 40% y 60% respectivamente, a lo cual se le adiciona TFA, el cual debe estar al 0,1% en la solución.

Disolvente B: mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 80% y 20% respectivamente, con TFA al 0,1%.

El agua destilada utilizada debe tener calidad HPLC ( $<15\text{mega}\Omega$  de resistencia). Una vez preparados deben ser sonicados durante 4-5 minutos para extraer el gas.

### PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO

Las muestras de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub> son preparadas por hemólisis de los eritrocitos lavados previamente tres veces con solución salina fisiológica. A estos eritrocitos se les agrega un volumen igual de agua destilada, el tubo es agitado con un vórtex durante unos segundos, seguidamente se adiciona 0,05mL de KCN al 5% y se mezcla.

La hemólisis completa de los hematíes puede requerir entre 10-15 minutos a temperatura ambiente. Los hemolizados deben prepararse y utilizarse el mismo día. El hemolizado es centrifugado durante 3-5 minutos a 3.700 rpm. Posteriormente se cogen 5-10 $\mu$ L de la muestra con una jeringa Hamilton y se procede a inyectarla a la columna.

## PROCEDIMIENTO

La longitud de onda del detector UV-VIS debe estar a 220 nm. Para el estudio de las cadenas de globina se utilizó un gradiente lineal del disolvente B de 49,5% hasta el 40% a los 60 minutos del cromatograma, con un flujo constante de 1mL/minuto. Los siguientes 15 minutos, es decir, desde los 60 hasta los 75 minutos se realiza la purga de la columna, y finalmente los últimos 5 minutos tiene lugar el reequilibrio para a continuación proceder a inyectar una nueva muestra.

## V.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### V.3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN

El estudio molecular comenzó mediante la extracción automática del ADN genómico (Biorobot EZ1; Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). El ADN se obtiene a partir de leucocitos de sangre periférica.

La extracción se realiza mediante la ruptura de membranas, eliminación de proteínas y restos de membranas, aislamiento del material genético y purificación del mismo para ello, la técnica empleada utiliza partículas magnéticas revestidas con sílice y permite realizar la extracción simultánea de 6 muestras. El robot tiene un sellado automatizado de la puerta del instrumento para reducir las probabilidades de contaminación ambiental.

## REACTIVOS

- EZ1<sup>®</sup> DNA Blood 350 µl Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) (Ref. 1023729).



### PROCEDIMIENTO

Se carga en el instrumento 350 µl de muestra de sangre completa anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>. El ADN genómico es purificado de forma automática mediante los siguientes pasos: lisis, adición de las partículas magnéticas a las muestras, unión del ADN a las partículas magnéticas, separación magnética, lavado, separación magnética y elución. El ADN genómico se recoge en un volumen de 200µl.

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DE LA PUREZA DEL ADN

La determinación de la concentración y pureza del ADN se realizó con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Para realizar las mediciones se emplea una gota de aproximadamente 1µL de la muestra de ADN genómico extraído.

La concentración de DNA se puede estimar utilizando una longitud de onda de 260 nm, debido a que las bases púricas y pirimidínicas del ADN tienen la propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda. El ADN bicatenario absorbe con una relación de una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivalente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena.

$$\mu\text{g/mL} = \text{DO}_{260} \times 50$$

La determinación de la pureza de ADN se establece mediante la lectura de las absorbancias a 260 y 280 nm. En las preparaciones de ácidos nucleicos, son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobreestimaciones de la concentración de ácidos nucleicos. La concentración de proteína puede ser evaluada a

una absorbancia de 280 nm, por lo que es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente  $DO_{260}/DO_{280}$ . La presencia de proteínas en la muestra hará que el cociente sea menor que el esperado para ácidos nucleicos puros. En una muestra pura se debe esperar un ratio de  $DO_{260}/DO_{280} \geq 1.8$ .

### V.3.2 SCREENING DE $\alpha$ -TALASEMIA

Las mutaciones responsables de  $\alpha$ -talasemia más frecuentes fueron estudiadas por PCR múltiple seguida de una hibridación reversa con el kit comercial  *$\alpha$ -globin StripAssay* (ViennaLab Diagnostic GmbH, Viena, Austria).

El ensayo cubre las 21 mutaciones responsables de  $\alpha$ -talasemia más frecuentes.

Entre las grandes deleciones detecta la  $-\alpha^{3,7}$ ,  $-\alpha^{4,2}$ , --MED, --SEA, --THAI, --FIL, deleción de 20,5Kb y la triplicación anti 3,7.

Entre las mutaciones puntuales pone de manifiesto la  $\alpha_1$  CD14 (TGG>TAG), Hb Adana de  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$  CD59 GGC>GAC), Hb Adana de  $\alpha_1$  ( $\alpha_1$  CD59 GGC>GAC), NcoI de  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$  CD iniciación ATG>ACG),  $\alpha_2$  CD19 (-G), HphI ( $\alpha_2$  IVS1 -5nt), Hb Quong Sze ( $\alpha_2$  CD125 CTG>CCG), Hb Constant Spring ( $\alpha_2$  CD142 TAA>CAA), Hb Icaria ( $\alpha_2$  CD142 TAA>AAA), Hb Paksé ( $\alpha_2$  CD142 TAA>TAT), Hb Koya Dora ( $\alpha_2$  CD142 TAA>TCA), T-Saudí ( $\alpha_2$  poly A-1 o AATAAA>AATAAG) y  $\alpha_2$  Poly A-2 (AATAAA>AATGAA).

### REACTIVOS

- *$\alpha$ -globin StripAssay* (ViennaLab Diagnostic GmbH, Viena, Austria) (Ref. 4-160).

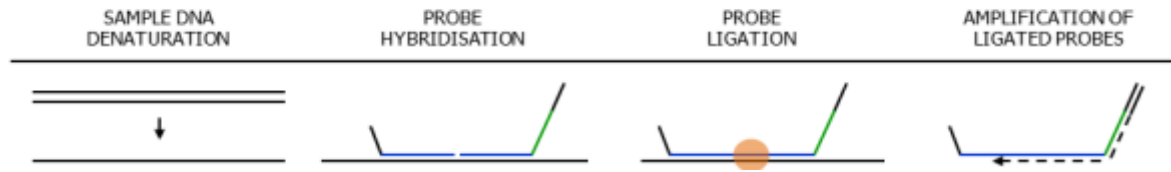
### PROCEDIMIENTO

Para llevar a cabo esta metodología es necesaria una desnaturalización del ADN. Seguidamente se produce una amplificación por PCR usando oligonucleótidos o *primers* unidos a biotina. Finalmente, se produce la hibridación de los productos de amplificación en las tiras de ensayo que contienen sondas alelo-específicas inmovilizadas en una matriz de líneas paralelas. El revelado de las tiras se realiza utilizando estreptavidina unida a fosfatasa alcalina y sustratos de color.

#### **V.3.3 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)**

La metodología del MLPA (Amplificación Múltiple dependiente de la Ligación de Sondas) se basa en la amplificación, con el uso de un único par de cebadores, de hasta 60 sondas, en cada una de las cuales se detecta una secuencia específica de ADN de aproximadamente 60 nt de longitud.

Después de la desnaturalización del ADN de la muestra, se añade una mezcla de sondas de MLPA a la muestra. Cada sonda MLPA se compone de dos oligonucleótidos que deben hibridar con secuencias diana inmediatamente adyacentes a fin de ligarse en una sola sonda. Cada sonda de la mezcla tiene un amplicón de longitud única y que normalmente oscila entre 130 y 500 nt. Durante la posterior PCR todas las sondas ligadas se amplifican simultáneamente utilizando el mismo par cebador de PCR. Uno de los cebadores está marcado con fluorescencia, permitiendo que los productos de amplificación puedan ser visualizados durante la separación de los fragmentos (Figura 17).



**Figura 17: Etapas o reacciones de la metodología del MLPA.**

Extraída de: Protocolo de MLPA (MRC-Holland b.v. Ámsterdam, Países Bajos). En primer lugar, se realiza una desnaturalización del ADN, seguidamente se produce la hibridación de los fragmentos de las sondas para que a continuación se ligen. Finalmente, tiene lugar la amplificación de las sondas ligadas.

Esta separación tiene lugar en un instrumento de electroforesis capilar, produciendo un electroferograma específico. La altura relativa de cada uno de los picos de cada sonda individual se compara con la altura del pico de esa misma sonda en diferentes muestras de ADN de referencia. Esta comparación refleja el número de copias de la secuencia diana correspondiente en la muestra. Una delección de una o más secuencias diana se reconoce por una disminución relativa en la altura del pico, mientras que un aumento en la altura relativa del pico refleja una amplificación.

## REACTIVOS

- SALSA MLPA P140 HBA probemix – 100 rxn (MRC-Holland b.v. Ámsterdam, Países Bajos) (Ref. P140-100R). Contiene 45 sondas con amplicones de entre 130 y 481 nt. 34 sondas son para el *cluster α* y 11 son sondas de referencia que detectan secuencias fuera de esta región.
- SALSA MLPA EK1 reagent kit – 100 rxn (MRC-Holland b.v. Amsterdam, Países Bajos) (Ref. EK1-FAM).

PROCEDIMIENTO

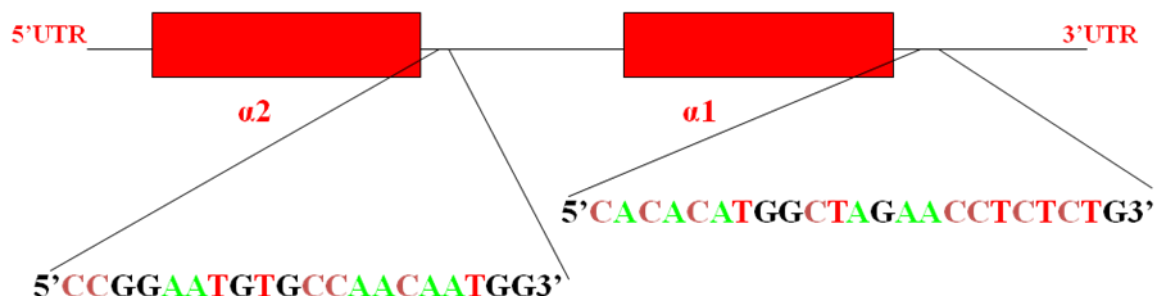
1. Desnaturalización del ADN.
  - a. 5 minutos a 98°C.
  - b. 25°C hasta la siguiente reacción.
2. Reacción de hibridación.
  - a. 1 minuto a 95°C.
  - b. De 16 a 24 horas a 60°C.
3. Reacción de ligación.
  - a. 20 minutos a 54°C.
  - b. 5 minutos a 98°C.
  - c. 20°C hasta la siguiente reacción.
4. Reacción de amplificación.
  - a. 35 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C.
  - b. 20 minutos a 72°C.
  - c. 15°C hasta el momento de preparar la electroforesis capilar.
5. Electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.).

### V.3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Amplificación específica para el gen correspondiente ( $\alpha_2$  o  $\alpha_1$ ): la especificidad la confiere el *primer* de 3'UTR (Figura 18), ya que las regiones no homólogas entre ambos genes se encuentran en el ISV-II y en 3'UTR.

El gen  $\alpha_2$  es amplificado específicamente con los *primers* P1a (5'AGC GCC GCC CGG CCG GGC GT 3') y C3R (5'CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG 3'), específico para la región 3'UTR del gen  $\alpha_2$  de globina), obteniéndose un producto de amplificación de 947 pb.

A su vez, el gen  $\alpha_1$  es amplificado específicamente con los *primers* P1a (5'AGC GCC GCC CGG CCG GGC GT 3') y C2R (5'CAG AGA GGT TCT AGC CAT GTG TG 3'), obteniéndose un amplicón de 956 pb.



**Figura 18:** Secuencias específicas en 3'UTR de ambos genes  $\alpha$  utilizadas para que la amplificación sea específica.

#### REACTIVOS

- Agua destilada.
- Buffer 10X comercial ( $\text{MgCl}_2$ ) (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).
- dNTPs (DeoxiriboNucleotidos Trifosfato) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- DMSO (DiMetilSulfÓxido) (Bioniche pharma, Chicago, IL, USA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Oligonucleótidos (Metabion International AG, Múnich, Alemania).
- Taq DNA Polimerasa (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

### PROCEDIMIENTO

1. Preparación de la *mix* o mezcla de reacción:

Reactivos	Concentración inicial (mmol/L)	Volumen (μL)	Concentración final (mmol/L)
Agua destilada		58	
Buffer 10X comercial (MgCl <sub>2</sub> )		7,7	
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10	5,5	0,55
DMSO		5,9	
Primer P1a	0,05	1,4	0,0007
Primer C3R o C2R *	0,05	1,4	0,0007

\* C3R se usa cuando se quiere amplificar el gen  $\alpha_2$  y C2R para amplificar  $\alpha_1$ .

2. Preparación de los tubos de reacción: Añadir a cada tubo 80μL de la *mix* y 20μL del ADN correspondiente a cada paciente. Llevar al termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
3. Desnaturalización inicial: 7 minutos a 99°C. Como es una *Hot start* PCR, la polimerasa no se dispensó en los tubos junto con la mezcla de reacción, sino que se realiza tras la desnaturalización inicial. Se añade a cada tubo 1μL de Taq DNA Polimerasa (5U de actividad enzimática).
4. Ciclos de la PCR: 25 ciclos sucesivos.
  - a. Desnaturalización de las hebras de ADN: 1 minuto a 95°C.

- b. Hibridación de los *primers* o cebadores (oligonucleótidos): 1 minuto a 56°C.
  - c. Elongación de las hebras por la Taq DNA Polimerasa: 2 minutos y 30 segundos a 72°C.
- 5. Elongación final: 10 minutos a 72°C.
  - 6. Conservación de las muestras: 4°C en nevera hasta su uso posterior.

### V.3.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

#### REACTIVOS

- Agua destilada (Serrasol, Laboratorios Serra Pamies, Reus, España).
- *Buffer* TBE 10X, Grado Biología Molecular (Promega, Madison, WI, USA).
- Persulfato amónico (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA).
- TEMED (N,N,N',N'-Tetra-Metil-EtilenDiamina) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania).
- Solución de Bis-Acrilamida al 40% (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA).
- BlueOrange<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI, USA).
- Marcador de pesos moleculares  $\Phi$ X174 digerido con HaeIII (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).
- Bromuro de etidio (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania).



## MATERIAL Y MÉTODOS

### PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AL 8%

Se mezclan 8mL de Tampón TBE 1X, 100 $\mu$ L de Persulfato Amónico (APS) al 25%, 10 $\mu$ L de TEMED y 2mL de la solución de Bis-Acrilamida al 40%.

Se vierte la mezcla del gel dentro de los cristales y se coloca el peine. Se espera a que gelifique, y se retira el peine cuidadosamente y en vertical de los pocillos. Se colocan los cristales con el gel en el portacristales, y se sella herméticamente antes de introducir en la cubeta de electroforesis. Finalmente se rellena la cámara con Tampón TBE 1X para mantener el gel hasta su uso.

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar un tubo con marcador de pesos moleculares y otro tubo por cada muestra. Los tubos llevan 10 $\mu$ L de tampón de carga (azul de bromofenol con glicerol, BlueOrange<sup>®</sup> o similar) y 5 $\mu$ L de la muestra o del marcador de pesos moleculares  $\Phi$ X174 digerido con HaeIII según corresponda. A continuación, se cargan las muestras en los pocillos del gel poniendo atención a no introducir burbujas de aire.

### CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS

De 40 a 60 minutos a una intensidad de entre 110V o 100V respectivamente.

### REVELADO DEL GEL

Se desmolda el gel de los cristales y se introduce en una cubeta con agua destilada o Tampón TBE 1X. Seguidamente, en el cuarto del Bromuro de Etidio se introduce el gel en la cubeta del bromuro de etidio durante 10 segundos. A continuación, se destiñe en otra cubeta de agua destilada o Tampón TBE 1X durante 5 minutos.

Finalmente, se coloca el gel en el transiluminador y se visualizan las bandas con luz UV.

### **V.3.6 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR**

El objetivo de realizar esta purificación del producto de la PCR es el de deshacerse de todos los restos de la reacción anterior con el fin de evitar interferencias en la secuenciación.

#### **REACTIVOS**

- UltraClean<sup>®</sup> PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO-BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA) (Ref. 12500-100).

#### **PROCEDIMIENTO**

Se añaden 500µL de SpinBind al producto de la PCR y se transfieren los aproximadamente 600µL al tubo con filtro. Se centrifuga 30 segundos a 13.200 rpm y se decanta el líquido del tubo para volver a colocar el filtro. Seguidamente, se añaden 300µL de SpinClean Buffer al filtro. Se centrifuga 30 segundos a 13.200 rpm y se decanta el líquido del tubo para volver a colocar el filtro. Se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 13.200 rpm. A continuación, se transfiere el filtro a un tubo para recolectar y se añaden 50µL de Elution Buffer al filtro y se centrifuga 1 minuto a 13.200 rpm. Finalmente se tira el filtro y se conserva el ADN en nevera a 4°C hasta su uso.

### **V.3.7 SECUENCIACIÓN**

El producto de la amplificación fue secuenciado con el Kit comercial ABI PRISM<sup>™</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminador V1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit según el

## MATERIAL Y MÉTODOS

método de Sanger. El resultado fue analizado en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.).

### REACTIVOS

- Agua destilada.
- Oligonucleótidos (Metabion International AG, Múnich, Alemania).
- ABI PRISM™ BigDye® Terminador V1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) (Ref. 4337451).
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).
- MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### PROCEDIMIENTO

1. Preparación de los tubos de reacción:

Reactivos	Concentración inicial (mmol/L)	Volumen (μL)	Concentración final (mmol/L)
Mix BigDye®		3	
Buffer BigDye®		2	
Agua destilada		10	
ADN amplificado		3	
<i>Primer *</i>	0,05	2	0,005

\*Utilizar el cebador que corresponda.

La secuenciación se realiza fragmentada por exones debido a la longitud de los genes (aproximadamente 0,9Kb), ya que la resolución de la electroforesis capilar abarca

hasta los 400pb máximo debido a que se utiliza el polímero POP-4<sup>TM</sup> para los capilares de 36cm. Además, una vez identificada una variante de hemoglobina, es necesaria una posterior secuenciación de la hebra complementaria para confirmar el diagnóstico y descartar posibles artefactos de la primera secuenciación.

<b>Tipo de tubo</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia del primer</b>
<b>Exón 1 <math>\alpha_2/\alpha_1</math></b>	P1a	5'AGC GCC GCC CGG CCG GGC GT 3'
<b>Exón 2 <math>\alpha_2/\alpha_1</math></b>	Pb	5'CCC GCC CGG ACC CAC A 3'
<b>Exón 3 <math>\alpha_2</math></b>	P1c	5' AGA TGG CGC CTT CCT CTC AG 3'
<b>Exón 3 <math>\alpha_1</math></b>	Pc	5'GCG GGT TGC GGG AGG T 3'
<b>Reversa Exón 1 <math>\alpha_2/\alpha_1</math></b>	C10	5'ACG GTT GAG GGT GGC CTG T3'
<b>Reversa Exón 2 <math>\alpha_2</math></b>	RE2	5'TGA GAG GAA GGC GCC ATC3'
<b>Reversa Exón 2 <math>\alpha_1</math></b>	R2	5'TGC GAG GAA GGC GCC ATC3'
<b>Reversa Exón 3 <math>\alpha_2</math></b>	C3R	5'CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG 3'
<b>Reversa Exón 3 <math>\alpha_1</math></b>	C2R	5'CAG AGA GGT TCT AGC CAT GTG TG 3'

2. Llevar al termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
3. Desnaturalización inicial: 3 minutos a 94°C.
4. Ciclos de la PCR de secuenciación: 25 ciclos sucesivos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- a. Desnaturalización de las hebras de ADN: 10 segundos a 96°C.
  - b. Hibridación de los *primers* o cebadores (oligonucleótidos): 5 segundos a 50°C.
  - c. Elongación de las hebras por la Sequenasa: 4 minutos a 60°C.
5. Conservación de las muestras: 4°C en nevera hasta su uso posterior.

### PURIFICACIÓN MANUAL DEL PRODUCTO DE LA SECUENCIACIÓN

1. Añadir 55µL de etanol 100% frío, 19µL de MgCl<sub>2</sub> 2mM y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar 40 minutos a 13.200 rpm y decantar los tubos.
3. Lavar con 100µL de etanol al 70% frío, centrifugar 5 minutos a 13.200 rpm y decantar los tubos.
4. Repetir el punto anterior 2 veces más, es decir, realizar el lavado con etanol al 70%, 3 veces en total.
5. Secar por evaporación durante 1 hora en centrífuga de vacío (DNA Speed Vac, DNA 120, Savant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### DESNATURALIZACIÓN Y ELECTROFORESIS CAPILAR

1. Añadir 30µL de formamida desionizada al tubo purificado e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
2. Transferir los tubos a una placa de 96 pocillos.
3. Desnaturalización por choque térmico con la ayuda de la formamida.

4. Llevar al secuenciador para realizar la electroforesis capilar.
5. Tras la electroforesis capilar, leer las secuencias con un programa de lectura de electroferogramas (Chromas2).

#### V.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los paquetes estadísticos utilizados para el análisis fueron SPSS *Statistics* 19 (IBM, Corp, Chicago, IL, USA).

Las variables cualitativas se representan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen con su media y desviación estándar (DE). A continuación se comprobó la normalidad de las variables mediante los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. La homocedasticidad se comprobó mediante el estadístico de Levene.

Para las variables normales se hizo el test de la T de Student cuando la variable categórica es dicotómica y el Análisis de la Varianza (ANOVA) cuando la variable categórica tiene 3 o más grupos.

Las variables que no cumplen el criterio de normalidad se representan mediante su mediana y el rango intercuartílico (RIC) y se compararon mediante pruebas no paramétricas: El test de U de Mann-Whitney para las variables dicotómicas y la prueba de Kruskal-Wallis para las variables no dicotómicas.

Para las variables no dicotómicas que siguen una distribución normal y que fueron significativas en los ANOVAs se realizaron pruebas *post hoc* de comparaciones múltiples por el método de Bonferroni y así poder establecer entre qué grupos se encuentran las diferencias. El contraste a posteriori en las variables no dicotómicas que no presentan una distribución normal y que fueron significativas por el método de

Kruskal-Wallis se realizó mediante el test de U de Mann-Whitney para los grupos apareados.

Finalmente, las comparaciones de variables cualitativas se realizaron mediante tablas de contingencia y el estadístico de Chi-cuadrado de Pearson.

Para todas las pruebas se acepta un nivel de significación del 5%.

### **V.5 ANÁLISIS *IN SILICO***

Las hemoglobinopatías descritas por primera vez en el presente trabajo han sido analizadas mediante los Software SIFT y PolyPhen-2 para establecer un *score* que determine si las nuevas variantes son benignas (hemoglobinopatías estructurales) o potencialmente dañinas (hemoglobinopatías inestables que cursan con un síndrome talasémico).

## **VI. RESULTADOS**





## VI.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO

A continuación se van a ir desglosando los resultados de tipo descriptivo realizados sobre los 1.623 pacientes que han sido incluidos en el estudio.

### VI.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

En primer lugar se analizaron las variables demográficas.

#### VI.1.1.1 Número de pacientes

Los 1.623 pacientes incluidos en el estudio se han recibido y estudiado a lo largo de un periodo de 6 años comprendidos entre el 1 de enero del 2009 y el 31 de diciembre del 2014. Los casos desglosados por año son los siguientes: 181 casos en 2009, 175 en 2010, 224 en 2011, 283 en 2012, 386 en 2013 y 374 en 2014 (Figura 19).

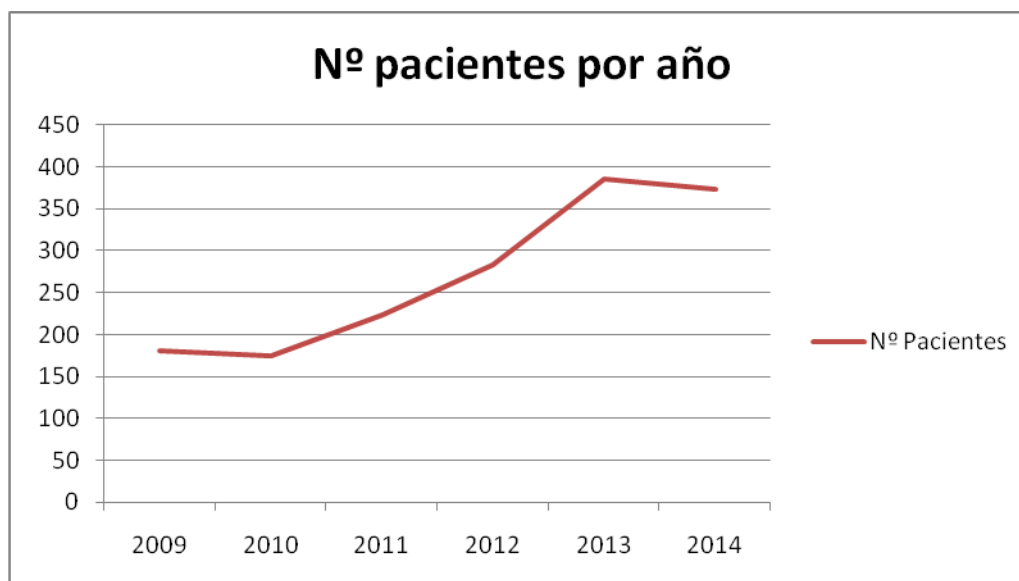


Figura 19: Numero de pacientes recibidos desglosados por año.

### VI.1.1.2 Distribución del sexo en los individuos estudiados

El balance de sexos en los casos estudiados ( $N = 1.486$ ) es el siguiente: 715 hombres (48,1%) y 771 mujeres (51,9%). Se desconoce el sexo de 137 pacientes.

### VI.1.1.3 Distribución de la edad en los individuos estudiados

La media de edad de los sujetos estudiados es 30,95 años con una DE de 22,69. Se ha estratificado la edad de los sujetos de estudio y se ha calculado la frecuencia de casos para cada franja de edad como se refleja en la Figura 20. Se han contabilizado 317 casos (25,1%) con edades comprendidas entre los 0 y los 10 años, 177 (14%) entre 11 y 20 años, 150 (11,9%) entre 21 y 30 años, 201 (15,9%) entre 31 y 40 años, 155 (12,3%) entre 41 y 50 años, 104 (8,2%) entre 51 y 60 años, 79 (6,3%) entre 61 y 70 años, 57 (4,5%) entre 71 y 80 años, 18 (1,4%) entre 81 y 90 años y finalmente, 3 (0,2%) entre 91 y 100 años. Se desconoce la edad en 362 casos.

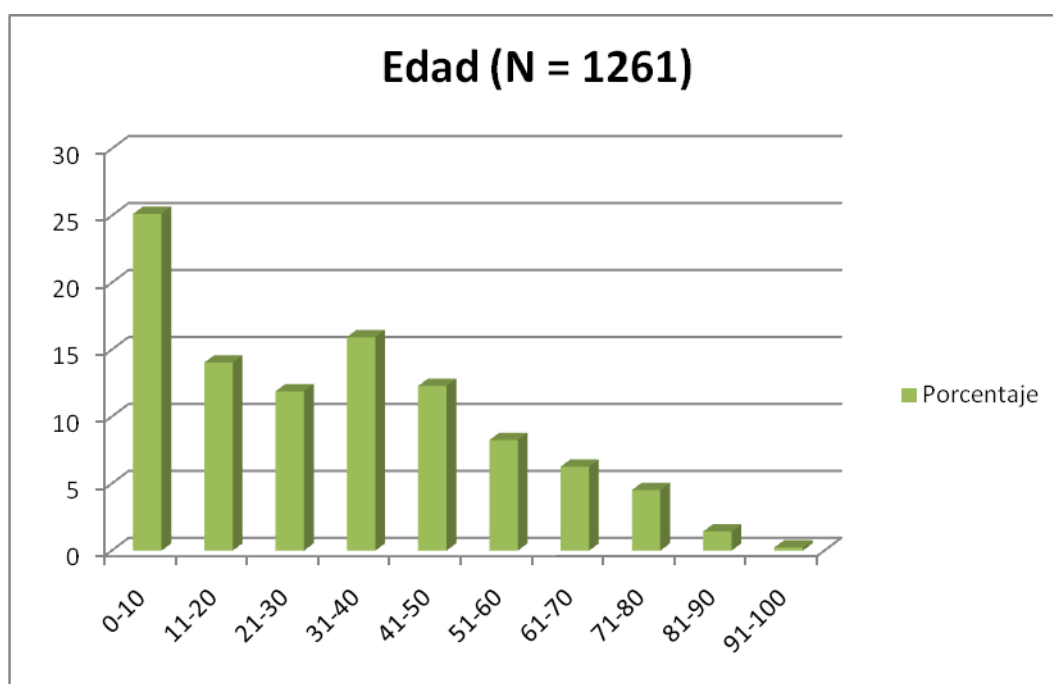
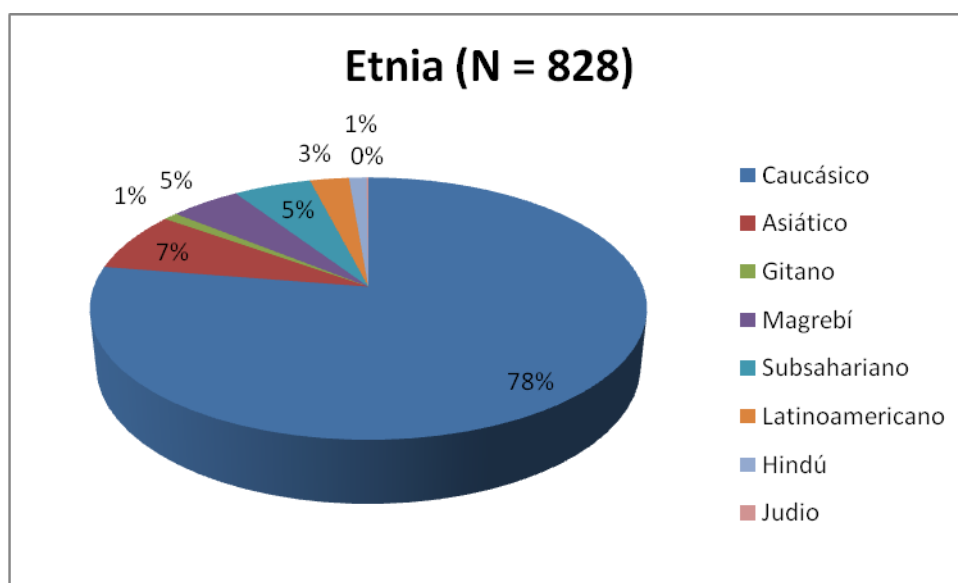


Figura 20: Edades en la muestra estudiada separada por franjas.

#### VI.1.1.4 Distribución de la etnia en los individuos estudiados

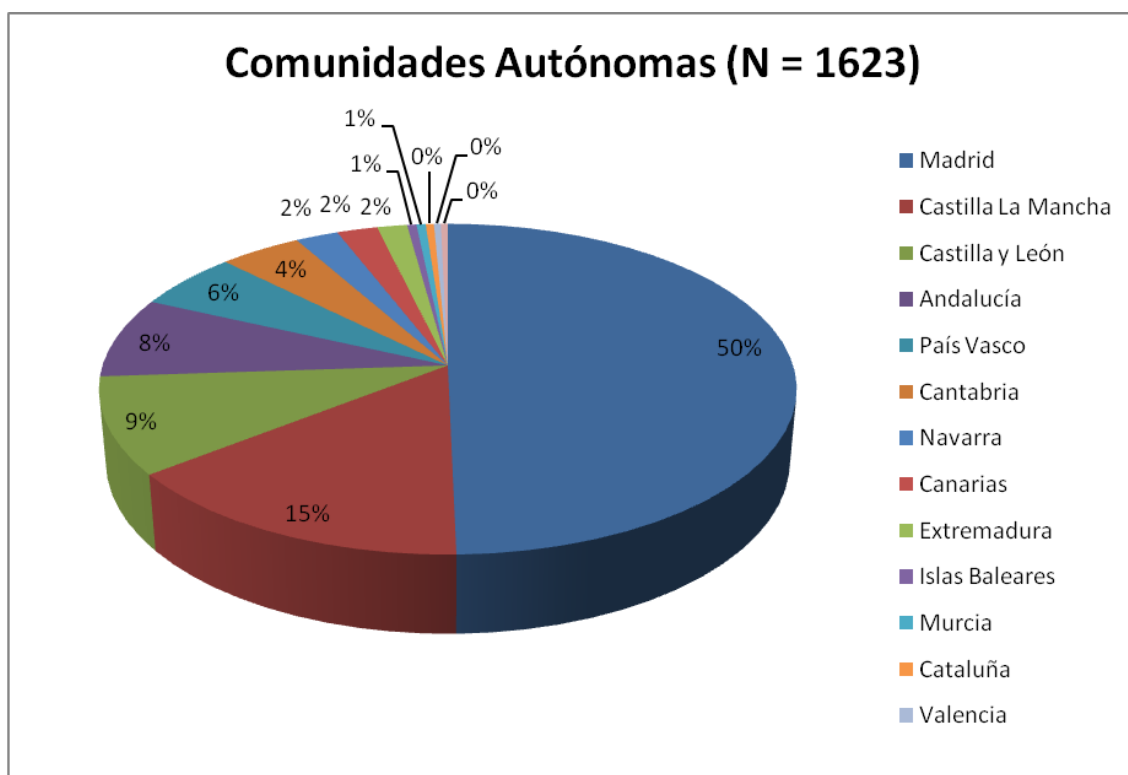
Se ha recogido, el origen étnico de los individuos estudiados, en la Figura 21. Se han encontrado 642 (77,5%) pacientes caucásicos, 61 (7,4%) asiáticos, 8 (1%) gitanos, 40 (4,8%) magrebí, 44 (5,3%) subsaharianos, 22 (2,7%) latinoamericanos, 10 (1,2%) hindús, y 1 (0,1%) judío. La etnia es desconocida en 795 individuos.



**Figura 21: Frecuencia de las etnias encontradas en la muestra estudiada.**

### VI.1.1.5 Lugar de residencia de los individuos de estudio

El lugar de residencia de los individuos participantes en el estudio ha sido desglosado por comunidades autónomas (Figura 22). Se han encontrado 806 (49,7%) individuos residentes en Madrid, 240 (14,8%) en Castilla La Mancha, 154 (9,5%) en Castilla y León, 128 (7,9%) en Andalucía, 91 (5,6%) en País Vasco, 71 (4,4%) en Cantabria, 37 (2,3%) en Navarra, 35 (2,2%) en Canarias, 26 (1,6%) en Extremadura, 8 (0,5%) en Islas Baleares, 8 (0,5%) en Murcia, 7 (0,4%) en Cataluña, 6 (0,4%) en Valencia y 6 (0,4%) en Asturias.

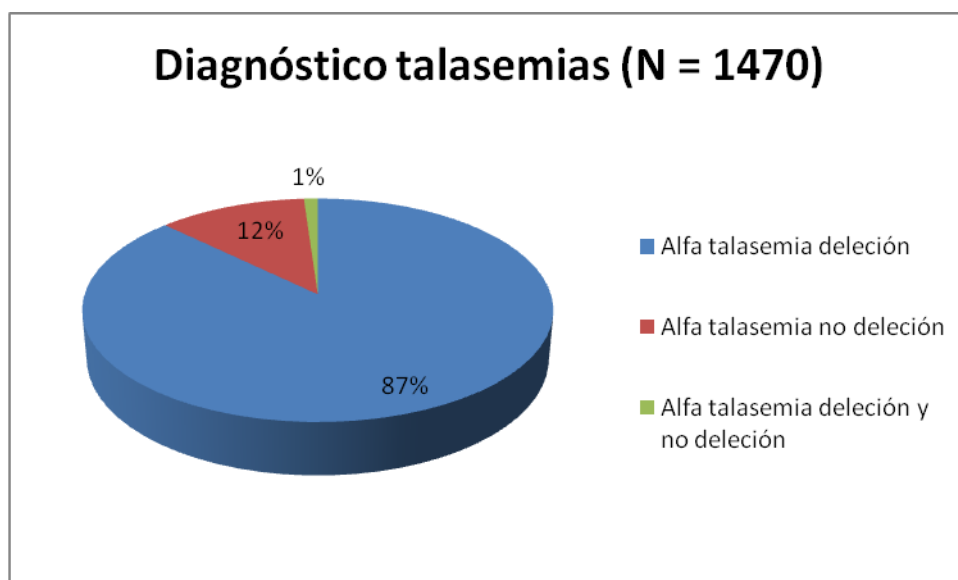


**Figura 22:** Frecuencia de casos desglosada por comunidades autónomas de residencia de los pacientes.

### VI.1.2 DATOS DE DIAGNÓSTICO

Se han recogido todos los pacientes con alteraciones en el *cluster* de los genes  $\alpha$ . Por un lado se han encontrado hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  (176 casos, 10,7%) y por otro  $\alpha$ -talasemias (1.470 casos, 89,3%).

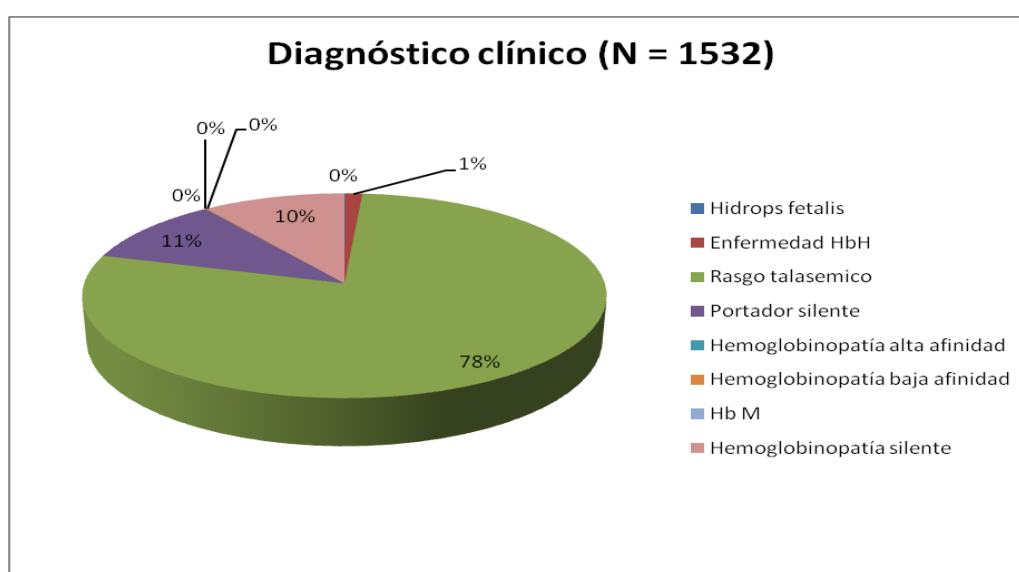
Profundizando en los casos de  $\alpha$ -talasemias, se han encontrado, 1.282 casos (87,2%) de  $\alpha$ -talasemias delección, 172 casos (11,7%) de  $\alpha$ -talasemias no delección y 16 individuos (1,1%) con la combinación de  $\alpha$ -talasemias delección y no delección (Figura 23).



**Figura 23:** Frecuencia de los diferentes tipos de alfa talasemias.

### VI.1.2.1 Diagnóstico clínico de los individuos de estudio

El diagnóstico de  $\alpha$ -talasemia y hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  han sido desglosados en 8 diagnósticos clínicos (Figura 24). Se han contabilizado 1 individuo (0,1%) con *Hidrops fetalis*, 18 (1,2%) pacientes con enfermedad de la Hb H, 1.200 (78,3%) rasgos talasémicos, 160 (10,4%) portadores silentes, 0 casos de hemoglobinopatías con alta afinidad, 2 (0,1%) hemoglobinopatías con baja afinidad por el oxígeno, 1 (0,1%) hemoglobinas M y 150 (9,8%) hemoglobinopatías silentes.



**Figura 24:** Frecuencia de los diferentes diagnósticos clínicos.

### VI.1.2.2 Diagnóstico genético de los individuos de estudio

#### A) Alfa talasemias deleción

A continuación, se recogen los casos de mutaciones responsables de  $\alpha$ -talasemia deleción en la población estudiada desglosados entre individuos heterocigotos y homocigotos para cada una de las alteraciones (Tabla IV).

**Tabla IV: Resumen de las  $\alpha$ -talasemias deleción encontradas en la población estudiada**

DIAGNÓSTICO GENÉTICO	CASOS HETEROCIGOTOS	CASOS HOMOCIGOTOS	TOTAL
<b>3.7</b>	759	365	1.124
SEA	68	0	68
FIL	19	0	19
<b>4.2</b>	15	1	16
HS-40	7	0	7
THAI	1	0	1
alfa0_min132Kb (sondas1-25)	9	0	9
alfa0_28y36Kb (sondas5-23)	5	0	5
MED	4	0	4
(SPAN)alfa0_9,5y11,2Kb (sondas10-24)	3	0	3
alfa0_min10,6Kb (sondas8-26)	3	0	3
alfa0_33.9y63.5Kb (sondas4-22)	3	0	3
alfa0_min18Kb (sondas7-25)	2	0	2
(CAL)alfa0_min21,7Kb (sondas6-25)	2	0	2
alfa0_min37Kb (sondas4-25)	1	0	1
alfa+_2.1y2.5Kb	1	0	1
alfa+_1,9y4,3Kb (sondas12-18)	1	0	1
alfa+_min6,5Kb (sondas19-25)	1	0	1
alfa+_min5,4Kb (sondas21-25)	1	0	1
<b>3.7+4.2</b>	10	0	10
<b>3.7+SEA</b>	5	0	5
<b>3.7+FIL</b>	3	0	3
<b>3.7+HS-40</b>	3	0	3
<b>3.7+alfa0_min132Kb (sondas1-25)</b>	2	0	2
<b>3.7+alfa0_min10,6Kb (sondas8-26)</b>	1	0	1
<b>3.7+alfa0_33.9y63.5Kb (sondas4-22)</b>	1	0	1
<b>3.7+alfa0_min8,2Kb (sondas12-25)</b>	1	0	1
SEA+FIL	1	0	1
<b>TOTAL</b>	932	366	1.298

Min = tamaño mínimo de la deleción; alfa0 =  $\alpha^0$  = Deleción de ambos genes alfa;  
 alfa+ =  $\alpha^+$  = Deleción de un gen alfa



### **B) Alfa talasemias no delección**

A continuación, se recogen los casos de mutaciones responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección en la población estudiada desglosados entre individuos heterocigotos y homocigotos para cada una de las alteraciones (Tabla V).

### **C) Hemoglobinopatías estructurales**

En la Tabla VI se analizan los casos de las mutaciones responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  en la población estudiada desglosados entre individuos heterocigotos y homocigotos para cada una de las alteraciones.

**Tabla V: Resumen de las  $\alpha$ -talasemias no delección encontradas en la población estudiada**

DIAGNÓSTICO GENÉTICO	CASOS HETEROCIGOTOS	CASOS HOMOCIGOTOS	TOTAL	GEN $\alpha$	LOCALIZACIÓN
Hph	64	1	65	2	IVS I-2 (-5nt)
Groene Hart	39	0	39	1	119(H2)Pro>Ser
Plasencia	14	0	14	2	125(H8)Leu>Arg
Agrinio	10	2	12	2	29(B10)Leu>Pro
3'UTR +778	7	0	7	1	3'UTR+778 C>A
Nco	4	0	4	2	CDi ATG>ACG
T-Saudí	4	0	4	2	Señal PolyA AATAAA>AATAA G
$\alpha_1$ IVS I-38 C>T	3	0	3	1	IVS I-38 C>T
3'UTR +832	3	0	3	2	3'UTR+832 G>A
CD23	3	0	3	2	23(B4)Glu>Stop
Constant Spring	3	0	3	2	142(Term) Stop>Gln
Tunis-Bizerte	3	0	3	1	129(H12)Leu>Pro
Cervantes	3	0	3	2	118(H1)Thr>Ile
Nco A1	2	0	2	1	CDi ATG>ACG
$\alpha_2$ IVS I-1 G>A	2	0	2	2	IVS I-1 G>A
$\alpha_1$ IVS I-1 G>A	1	0	1	1	IVS I-1 G>A
PA3	1	0	1	2	Señal PolyA AATAAA>AATA--
PA2	1	0	1	2	Señal PolyA AATAAA>AATGA A
Clinic Alfa2	1	0	1	2	61(E10)Lys>0
Cibeles	1	0	1	2	25(B6)Gly>Asp
$\alpha_2$ IVS I-1 G>T	1	0	1	2	IVS I-1 G>T
$\alpha_2$ IVS II-142 G>A	1	0	1	2	IVS II-142 G>A
Iberia	1	0	1	2	104(G11)Cys>Arg
$\alpha_1$ IVS II-148 A>G	1	0	1	1	IVS II-148 A>G
$\alpha_2$ IVS I-78 C>G	1	0	1	2	IVS I-78 C>G
$\alpha_1$ IVS I-116 A>G	1	0	1	1	IVS I-116 A>G
Marañón	1	0	1	2	31(B12)Arg>Gly
CD19(-G)	1	0	1	2	CD19(-G)
Gran Vía	1	0	1	2	32(B12)Met>Arg
Valdecilla	1	0	1	2	CDi ATG>ATT (Met>Ile)
Macarena	1	0	1	2	119(H2)Pro>Ser
El Retiro	1	0	1	2	120-121 ins GTG
CDi ATG>GTG	1	0	1	2	CDi ATG>GTG
CD22(-C)	1	0	1	2	CD22(-C)
Adana	1	0	1	2	59(E8)Gly>Asp
$\alpha_1$ IVS I-117 G>A	1	0	1	1	IVS I-117 G>A
<b>TOTAL</b>	<b>185</b>	<b>3</b>	<b>188</b>		

**Tabla VI: Resumen de las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  encontradas en la población estudiada**

DIAGNÓSTICO GENÉTICO	CASOS HETEROCIGOTOS	CASOS HOMOCIGOTOS	TOTAL	GEN $\alpha$	LOCALIZACIÓN
Le Lamentin	43	1	44	2	20(B1)His>Gly
J-Paris	34	1	35	2	12(A10)Ala>Asp
J-Camagüey	12	0	12	2	141(HC3)Arg>Gly
G-Philadelphia	10	0	10	2	68(E17)Asn>Lys
Nunobiki	9	0	9	2	141(HC3)Arg>Cys
El Bonillo	8	0	8	1	45(CE3)His>Asn
J-Pontoise	6	0	6	2	63(E12)Ala>Asp
Beziers	5	0	5	1	99(G6)Lys>Asn
Setif	5	0	5	2	94(G1)Asp>Tyr
Burgos	3	1	4	1	64(E13)Asp>Asn
Q-India	3	0	3	2	64(E13)Asp>His
Manitoba I	3	0	3	2	102(G9)Ser>Arg
Riccarton	3	0	3	1	51(CE9)Gly>Ser
Puerta del Sol	3	0	3	1	49(CE7)Ser>Arg
Q-Thailandia	2	0	2	1	74(EF3)Asp>His
O-Indonesia	2	0	2	1	116(GH4)Glu>Lys
Denmark Hill	2	0	2	1	95(G2)Pro>Ala
Watts	2	0	2	2	74(EF3)Asp>0 o 75(EF4)Asp>0
Lansing	2	0	2	1	87(F8)His>Gln
M-Boston	1	0	1	2	58(E7)His>Tyr
Titusville	1	0	1	1	94(G1)Asp>Asn
Goya	1	0	1	2	52-59 del 24pb
Atago	1	0	1	2	85(F6)Asp>Tyr
Çapa	1	0	1	1	94(G1)Asp>Gly
Belliards	1	0	1	2	56(E5)Lys>Asn
J-Cape Town	1	0	1	2	92(FG4)Arg>Gln
Al Ain Abu Dhabi	1	0	1	2	18(A16)Gly>Asp
J-Medellín	1	0	1	2	22(B3)Gly>Asp
Garden State	1	0	1	1	82(F3)Ala>Asp
La Mancha	1	0	1	2	91(FG3)Leu>Arg
Grady	1	0	1	1	Thr119_Pro120 insGluPheThr
Kawachi	1	0	1	2	44(CE2)Pro>Arg
Delfzicht	1	0	1	1	9(A7)Asn>Lys
J-Broussais	1	0	1	2	90(FG2)Lys>Asp
Hasharon	1	0	1	2	47(CE5)Asp>His
<b>TOTAL</b>	173	3	176		

Seguidamente, se ha desglosado el número de casos de  $\alpha$ -talasemia no delección y de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  por Comunidad Autónoma de residencia y además se ha contabilizado la mutación más frecuente de cada tipo en cada Comunidad (Tabla VII).

**Tabla VII: Número de casos de  $\alpha$ -talasemia no delección y hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  desglosados por Comunidad Autónoma de residencia**

COMUNIDAD AUTÓNOMA	ALFA-TALASEMIA NO DELECCIÓN		HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES	
	Nº PACIENTES	MUTACIÓN MAYORITARIA Y FRECUENCIA	Nº PACIENTES	MUTACIÓN MAYORITARIA Y FRECUENCIA
Madrid	91	Hph (39,6%)	37	G-Philadelphia (18,9%)
Castilla La Mancha	27	Hph (29,6%) / Groene Hart (29,6%)	47	Le Lamentin (68,1%)
Castilla y León	20	Hph (40%)	28	J-Paris (64,3%)
Andalucía	13	Hph (46,2%)	43	Nunobiki (18,6%)
País Vasco	6	Groene Hart (50%)	7	J-Paris (28,6%) / Denmark Hill (28,6%)
Cantabria	4	Groene Hart (25%)	7	J-Paris (71,4%)
Navarra	3	Groene Hart	3	J-Camagüey
Canarias	9	Groene Hart	0	---
Extremadura	8	Hph	0	---
Islas Baleares	0	---	0	---
Murcia	1	$\alpha_1$ IVS II-148 A>G	2	Nunobiki / Le Lamentin
Cataluña	6	Agrinio	0	---
Valencia	0	---	2	Lansing
Asturias	0	---	0	---
<b>TOTAL</b>	188		176	

## VI.2 ESTUDIO COMPARATIVO

A continuación, se van a ir desglosando los resultados de tipo analítico realizados sobre los 1.362 pacientes que han sido seleccionados para estos estudios, habiéndose descartado previamente a todos aquellos pacientes que tuvieran alguna condición asociada (ferropenia, beta talasemia, hemoglobinopatías estructurales de cadena beta o triplicaciones de los genes alfa asociadas o no a beta talasemia).

### **VI.2.1 EDAD**

Los pacientes han sido divididos en 3 categorías: talasémicos, talasémicos y portadores de hemoglobinopatías estructurales simultáneamente (grupo mixto) y portadores de hemoglobinopatías estructurales. La mediana de edad es 28 años (RIC de 11-43), 28,5 años (2,5-66,25) y 67 años (51-78) respectivamente.

Por el test de Kruskal-Wallis se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0,001$ ). Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los talasémicos y los portadores de hemoglobinopatías estructurales ( $p < 0,001$ ) y entre el grupo mixto y los portadores de hemoglobinopatías estructurales ( $p = 0,003$ ).

### **VI.2.2 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN TALASEMIAS**

#### **VI.2.2.1 Alfa talasemias**

Los pacientes con alfa talasemia han sido divididos en 8 grupos de acuerdo al diagnóstico genético y al número de genes funcionales. En estos pacientes se han realizado las medias o medianas de los parámetros hematimétricos así como de los niveles de Hb A<sub>2</sub> y Hb F. En la Tabla VIII se especifican estos resultados. A continuación, en la Tabla IX, se desglosan los casos de alfa talasemia delección para 2 genes funcionales según estén en cis o en trans.

**Tabla VIII: Resumen hematimétrico de los diferentes diagnósticos de alfa talasemia a nivel genotípico.**

GENOTIPO								
HEMATIMETRÍA	(--/--) N =1	(--/- $\alpha$ ) N =16	(--/ $\alpha^T\alpha$ ) N =1	(--/ $\alpha\alpha$ ) (- $\alpha$ /- $\alpha$ ) N =436 *	( $\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha$ ) ( $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ) N =3 **	(- $\alpha/\alpha^T\alpha$ ) N =15	(- $\alpha/\alpha\alpha$ ) N =553	( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ) N =160
Eritrocitos (x10 <sup>12</sup> /L)	--	5,61 ± 0,5	4,6	5,55 (5,1-6,0)	4,8 (3,9-5,2)	6 (5,5-6,5)	5,3 (4,9-5,6)	5,3 (5-5,7)
Hb (g/dL)	5	10,11 ± 1,1	8,7	12,2 (11,5-13,3)	10,8 (9,2-11,2)	12,9 (11,6-13,7)	13,4 (12,4-14,4)	13,3 (12,5-14,3)
Hematocrito (%)	--	34,79 ± 3,7	32,9	38,9 (36,5-42,6)	33,3 (30,1-34,7)	40,9 (36,4-44,5)	41,5 (38,4-44,7)	42 (38,5-44,7)
VCM (fL)	--	62,36 ± 5,5	71,2	70,8 (67,8-74,6)	66,4 (62,5-84,5)	68 (65,8-70,9)	79,8 (76,3-82,7)	78,4 (75-80,8)
HCM (pg)	--	18,09 ± 1,1	18,8	22,33 ± 1,6	22,63 ± 4,3	21,4 ± 1,4	25,7 (24,7-26,7)	25,1 (23,9-26,1)
CHCM (g/L)	--	29,12 ± 1,8	26,3	31,6 (30,9-32,1)	32,2 (30,5-32,4)	31,5 (31-31,6)	32,4 (31,7-33)	32,3 (31,6-32,8)
RDW (%)	--	26,89 ± 3,8	22,9	15,7 (14,9-16,6)	17,3 (16,8-26,1)	16 (15,5-16,9)	14,6 (13,9-15,6)	14,7 (13,9-15,5)
Reticulocitos (x100)	--	2,58 ± 1,0	2,5	0,8 (0,6-1,1)	3 (1,8-3,6)	0,9 (0,6-1,4)	0,7 (0,5-1)	0,7 (0,5-1,1)
Hb A <sub>2</sub> (%)	0	1,53 ± 0,4	3	2,6 (2,4-2,7)	2,6 (2,4-2,8)	2,5 (2,3-2,7)	2,7 (2,5-2,9)	2,8 (2,6-2,9)
Hb F (%)	0	0,63 ± 0,5	15	0,3 (0,1-0,6)	7 (0,6-9)	0,3 (0,1-0,7)	0,2 (0,1-0,5)	0,2 (0,2-0,4)

Los valores de la distribución se expresan en función de la media ± la desviación estándar o mediante la mediana y (rango intercuartílico).

\*No se han separado los casos (--/ $\alpha\alpha$ ) de los (- $\alpha$ /- $\alpha$ ) pero se hará una referencia posterior.

\*\*No se han separado los casos ( $\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha$ ) de los ( $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ) debido al escaso número de individuos.

**Tabla IX: Resumen hematimétrico de la alfa talasemia delección para 2 genes funcionales en cis o en trans.**

GENOTIPO	(--/ $\alpha\alpha$ )	(- $\alpha$ /- $\alpha$ )
HEMATIMETRÍA	N =123	N =313
Eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )	5,8 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,6
Hb (g/dL)	12,2 $\pm$ 1,5	12,4 $\pm$ 1,5
Hematocrito (%)	39,4 $\pm$ 5,1	39,6 $\pm$ 4,8
VCM (fL)	68,4 $\pm$ 5,8	72,3 $\pm$ 4,6
HCM (pg)	21,3 $\pm$ 1,5	22,8 $\pm$ 1,5
CHCM (g/L)	31,1 $\pm$ 1,5	31,5 $\pm$ 1
RDW (%)	17 $\pm$ 4,1	15,7 $\pm$ 1,5
Reticulocitos ( $\times 100$ )	0,9 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,5
Hb A <sub>2</sub> (%)	2,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,3
Hb F (%)	0,7 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,6

Los valores de la distribución se expresan en función de la media  $\pm$  la desviación estándar.

#### **A) 2 genes funcionales**

Los pacientes han sido divididos en 3 categorías: alfa talasemia delección, alfa talasemia no delección y con la combinación de delección y no delección. En la Tabla X se resumen las variables hematimétricas y el nivel de significación estadística para las diferencias entre grupos.

**Tabla X: Comparación de medias o medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias delección y no delección con 2 genes funcionales.**

GENOTIPO	(--/αα)	(α <sup>T</sup> α <sup>T</sup> /αα)		
HEMATIMETRÍA	(-α/-α) N =436 α-Talasemia delección	(α <sup>T</sup> α/α <sup>T</sup> α) N =3 α-Talasemia no delección	(-α/α <sup>T</sup> α) N =15 Grupo mixto	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Eritrocitos (x10 <sup>12</sup> /L)	5,55 (5,1-6,0) <sup>a,b</sup>	4,8 (3,9-5,2) <sup>c</sup>	6 (5,5-6,5)	p=0,008*
Hb (g/dL)	12,2 (11,5-13,3) <sup>a</sup>	10,8 (9,2-11,2) <sup>c</sup>	12,9 (11,6-13,7)	p=0,042*
Hematocrito (%)	38,9 (36,5-42,6) <sup>a</sup>	33,3 (30,1-34,7) <sup>c</sup>	40,9 (36,4-44,5)	p=0,025*
VCM (fL)	70,8 (67,8-74,6)	66,4 (62,5-84,5)	68 (65,8-70,9)	p=0,121
HCM (pg)	22,33 ± 1,6	22,63 ± 4,3	21,4 ± 1,4	p=0,09
CHCM (g/L)	31,6 (30,9-32,1)	32,2 (30,5-32,4)	31,5 (31-31,6)	p=0,407
RDW (%)	15,7 (14,9-16,6) <sup>a</sup>	17,3 (16,8-26,1)	16 (15,5-16,9)	p=0,037*
Reticulocitos (x100)	0,8 (0,6-1,1) <sup>a</sup>	3 (1,8-3,6) <sup>c</sup>	0,9 (0,6-1,4)	p=0,012*
Hb A <sub>2</sub> (%)	2,6 (2,4-2,7)	2,6 (2,4-2,8)	2,5 (2,3-2,7)	p=0,528
Hb F (%)	0,3 (0,1-0,6) <sup>a</sup>	7 (0,6-9) <sup>c</sup>	0,3 (0,1-0,7)	p=0,038*

Los valores de la distribución se expresan en función de la media ± la desviación estándar o mediante la mediana y (rango intercuartílico).

\*Diferencias estadísticamente significativas para la variable.

<sup>a</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de alfa talasemia delección y el grupo de alfa talasemia no delección.

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de alfa talasemia delección y el grupo mixto.

<sup>c</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de alfa talasemia no delección y el grupo mixto.



**B) 3 genes funcionales**

Los pacientes han sido divididos en 2 categorías: alfa talasemia deleción y alfa talasemia no deleción. En la Tabla XI se resumen las variables hematimétricas y el nivel de significación estadística para las diferencias entre grupos.

**Tabla XI: Comparación de medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias deleción y no deleción con 3 genes funcionales.**

GENOTIPO	(- $\alpha/\alpha\alpha$ )	( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ )	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
HEMATIMETRÍA	N =553	N =160	
Eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )	5,25 (4,9-5,6)	5,36 (5-5,7)	p=0,03*
Hb (g/dL)	13,4 (12,4-14,4)	13,3 (12,5-14,3)	p=0,915
Hematocrito (%)	41,5 (38,4-44,7)	42 (38,5-44,7)	p=0,760
VCM (fL)	79,8 (76,3-82,7)	78,4 (75-80,8)	p<0,001*
HCM (pg)	25,7 (24,7-26,7)	25,1 (23,9-26,1)	p<0,001*
CHCM (g/L)	32,4 (31,7-33)	32,3 (31,6-32,8)	p=0,106
RDW (%)	14,6 (13,9-15,6)	14,7 (13,9-15,5)	p=0,704
Reticulocitos ( $\times 100$ )	0,7 (0,5-1)	0,7 (0,5-1,1)	p=0,308
Hb A <sub>2</sub> (%)	2,7 (2,5-2,9)	2,8 (2,6-2,9)	p=0,002*
Hb F (%)	0,2 (0,1-0,5)	0,2 (0,2-0,4)	p=0,752

Los valores de la distribución se expresan en función de la mediana y (rango intercuartílico).

\*Diferencias estadísticamente significativas para la variable.

**VI.2.2.2 Alfa talasemia no deleción**

Los pacientes con alfa talasemia no deleción y 3 genes funcionales (alfa talasemia no deleción heterocigota) han sido divididos en 2 grupos atendiendo a si la mutación se encuentra en el gen  $\alpha_2$  o en el gen  $\alpha_1$ . En estos pacientes se han realizado las medias y medianas de los parámetros hematimétricos así como de los niveles de Hb A<sub>2</sub> y Hb F (Tabla XII).

**Tabla XII: Comparación de medias o medianas de los parámetros hematimétricos entre las talasemias no deleción heterocigotas en función del gen afectado.**

HEMATIMETRÍA	GEN $\alpha_2$ Mediana (RIC) N =109	GEN $\alpha_1$ Mediana (RIC) N =51	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )	5,37 (5-5,8)	5,28 (4,9-5,6)	p=0,045*
Hb (g/dL)	13,3 (12,2-14,4)	13,3 (12,7-14,1)	p=0,787
Hematocrito (%)	41,4 (38-45)	42,2 (38,7-44)	p=0,953
VCM (fL)	77,32 $\pm$ 4,7	79,38 $\pm$ 4,1	p=0,06
HCM (pg)	24,5 (23,2-25,5)	26 (24,5-26,4)	p<0,001*
CHCM (g/L)	31,9 (31,5-32,6)	32,7 (31,5-33,1)	p=0,005*
RDW (%)	15 (14,2-15,8)	14,3 (13,8-15,5)	p=0,099
Reticulocitos ( $\times 100$ )	0,8 (0,5-1,1)	0,69 (0,5-1,1)	p=0,735
Hb A <sub>2</sub> (%)	2,7 (2,5-2,9)	2,85 (2,7-3)	p=0,002*
Hb F (%)	0,2 (0,2-0,4)	0,3 (0,2-0,4)	p=0,443

Los valores de la distribución se expresan en función de la media  $\pm$  la desviación estándar o mediante la mediana y (rango intercuartílico).

\*Diferencias estadísticamente significativas para la variable.

### VI.2.3 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Los pacientes con hemoglobinopatías estructurales de cadena alfa pertenecen a 35 grupos diferentes de acuerdo a la mutación encontrada. En estos pacientes se han realizado las medias de los parámetros hematimétricos así como de los niveles de Hb A<sub>2</sub>, Hb F, Hb X, RT y posición EZ (E-Zone o Posición en electroforesis capilar de zona) (Tabla XIII).

RESULTADOS

**Tabla XIII: Resumen hematimétrico y bioquímico de las diferentes hemoglobinopatías estructurales.**

HEMOGLOBINOPATÍA (N)	ERITROCITOS ( $\times 10^{12}/L$ )*	HB (g/dL)*	HEMATOCRITO (%)*	HB A <sub>2</sub> (%)*	HB F (%)*	HB X (%)*	TR (min)*	POSICIÓN EZ
Al Ain Abu Dhabi (1)	--	--	--	1,6	1,2	24	1,62	12
Atago (1)	4,42	14	42,3	1,9	0,3	24	4,15	7
Belliards (1)	--	--	--	1,6	0,7	24,5	1,65	12
Beziers (5)	4 $\pm$ 0,3	11,9 $\pm$ 0,3	40,1 $\pm$ 1,7	2,2 $\pm$ 0,2	0,72 $\pm$ 0,5	18,74 $\pm$ 3,7	1,79 $\pm$ 0,1	--
Burgos (4)	4,7	14,45 $\pm$ 1,4	44,7	1,8 $\pm$ 0,5	0,18 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 2,1	4,41 $\pm$ 0	6
Çapa (1)	--	--	--	3,5	0,1	16,7	4,71	7
Delfzicht (1)	5,25	12,8	39,3	0,7	1,2	15,7	3,96	7
Denmark Hill (2)	4,58 $\pm$ 0	11,4 $\pm$ 0,8	35,75 $\pm$ 1,8	2,65 $\pm$ 0,6	0,15 $\pm$ 0,1	36,7 $\pm$ 3,3	2,46 $\pm$ 0,1	7
El Bonillo (8)	--	--	--	2,07 $\pm$ 0,2	0,44 $\pm$ 0,2	19,13 $\pm$ 0,6	1,97 $\pm$ 0	--
G-Philadelphia (8)	5,63 $\pm$ 0,9	13,64 $\pm$ 1,4	41,56 $\pm$ 3,9	1,16 $\pm$ 0,4	0,61 $\pm$ 0,2	31,09 $\pm$ 2,9	4,11 $\pm$ 0,1	6
Garden State (1)	--	--	--	1,6	2,1	24,7	1,72	12
Goya (1)	4,55	12,6	38,9	2,4	1,8	13,5	1,35	12
Grady (1)	--	--	--	1,9	0,5	9,7	1,82	--
Hasharon (1)	4,41	12	34,7	2,1	2,2	21,2	4,79	5
J-Broussais (1)	--	--	--	1,7	0,6	21,4	1,82	12
J-Camagüey (11)	5,3 $\pm$ 0,5	14,14 $\pm$ 1,4	45,4 $\pm$ 5	2,21 $\pm$ 0,4	0,62 $\pm$ 0,3	14,6 $\pm$ 2,7	1,63 $\pm$ 0	12
J-Cape Town (1)	4,69	15,6	48,7	2,1	0,3	29,8	1,56	11
J-Medellín (1)	--	--	--	2	0,8	21,1	1,67	12
J-Paris (35)	4,63 $\pm$ 0,6	13,43 $\pm$ 1,8	43,56 $\pm$ 5,8	1,8 $\pm$ 0,3	0,84 $\pm$ 0,9	26,7 $\pm$ 2,3	1,76 $\pm$ 0	12
J-Pontoise (5)	2,78	12,7	25,7	2,26 $\pm$ 0,3	0,72 $\pm$ 0,6	13,5 $\pm$ 4,7	1,69 $\pm$ 0	12
Kawachi (1)	--	--	--	0,7	0,4	23	4,24	7
La Mancha (1)	--	15,6	--	1,8	0,3	21,9	4,19	6

\*Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla XII: Continuación.

HEMOGLOBINOPATÍA (N)	ERITROCITOS ( $\times 10^{12}/L$ )*	HB (g/dL)*	HEMATOCRITO (%)*	HB A <sub>2</sub> (%)*	HB F (%)*	HB X (%)*	TR (min)*	POSICIÓN EZ
Le Lamentin (41)	4,81 $\pm$ 0,3	14,38 $\pm$ 1,3	43,42 $\pm$ 3,1	2 $\pm$ 0,4	1,05 $\pm$ 0,9	29,37 $\pm$ 0,9	1,59 $\pm$ 0	--
M-Boston (1)	6,1	17,9	52,5	1,8	0,1	15	4,74	--
Manitoba I (3)	4,11 $\pm$ 0,9	11,93 $\pm$ 3	36,1 $\pm$ 7	2,6 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,7	17,47 $\pm$ 0,4	4,57 $\pm$ 0	7
Nunobiki (9)	4,31 $\pm$ 0,7	13,42 $\pm$ 2,2	41,68 $\pm$ 6,7	2,12 $\pm$ 0,4	3,58 $\pm$ 2,8	19,51 $\pm$ 1,6	1,59 $\pm$ 0,1	12
O-Indonesia (2)	4,98 $\pm$ 0	13,9 $\pm$ 0,3	44,55 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,2	10,05 $\pm$ 3	4,88 $\pm$ 0	5
Puerta del Sol (3)	4,36 $\pm$ 0,7	12,87 $\pm$ 3	34,35 $\pm$ 5,6	2,97 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3	16,27 $\pm$ 1,7	4,43 $\pm$ 0,1	4
Q-India (1)	3,71	11,3	34,4	2,9	0,7	17,6	4,77	6
Q-Thailandia (2)	5,45 $\pm$ 0,4	14,15 $\pm$ 1,9	42,7 $\pm$ 6,5	2,8 $\pm$ 0,3	0 $\pm$ 0	25,2 $\pm$ 0	4,64 $\pm$ 0	7
Riccarton (3)	--	--	--	2,07 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,2	12,17 $\pm$ 2	1,68 $\pm$ 0	11
Setif (5)	4,79 $\pm$ 0,5	12,82 $\pm$ 0,9	38,82 $\pm$ 3,1	2,78 $\pm$ 0,2	0,72 $\pm$ 0,6	16,86 $\pm$ 3,8	4,71 $\pm$ 0	6
Titusville (1)	4,6	12,3	38,8	2,6	0	16	4,72	6
Watts (1)	4,96	14,4	52,7	2,6	0,1	6,2	4,2	6

\*Media  $\pm$  desviación estándar.

### VI.2.3.1 Análisis de los porcentajes de hemoglobina por HPLC

Los pacientes han sido divididos en 3 categorías: hemoglobinopatías estructurales homocigotas, hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_2$  y hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_1$ .

Para el análisis estadístico se ha empleado el test de Kruskal-Wallis y se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para el porcentaje de Hb anormal (Hb X) (Tabla XIV).

**Tabla XIV: Comparación de medianas de los porcentajes de hemoglobina por HPLC entre las hemoglobinopatías estructurales atendiendo al gen afectado.**

VARIABLE	HOMOCIGOTAS N =3	HETEROCIGOTAS GEN $\alpha_2$ N =113	HETEROCIGOTAS GEN $\alpha_1$ N =28	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Hb A <sub>2</sub> (%)	1,1 (1,1-2,5)	2 (1,7-2,3)	2,2 (1,9-2,5)	p=0,127
Hb F (%)	1,1 (0,2-2,3)	0,6 (0,4-1,2)	0,45 (0,2-0,6)	p=0,072
Hb X (%)	47,4 (34,3-54,5) <sup>a,b</sup>	26,4 (18,7-29,1) <sup>c</sup>	17 (14,6-19,3)	p<0,001*

\*Diferencias estadísticamente significativas para la variable.

<sup>a</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hemoglobinopatías estructurales homocigotas y el grupo de hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_2$ .

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hemoglobinopatías estructurales homocigotas y el grupo de hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_1$ .

<sup>c</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_2$  y el grupo de hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_1$ .

### VI.2.3.2 Análisis del tiempo de retención

Las hemoglobinopatías han sido divididas en 3 categorías según el RT: rápidas (RT < 2,1 min), normales (2,1 min < RT < 3,1 min) y lentas (RT > 3,1 min). Por otro lado, han sido divididas en 3 categorías según el balance de carga: hemoglobinopatías de balance neto de carga “más negativo”, hemoglobinopatías de balance neto de carga “más positivo” y hemoglobinopatías de balance neto de carga “más apolar”.

A continuación, se enfrentaron ambas variables en una tabla de contingencia (Tabla XV) y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,001$ ).

**Tabla XV: Tabla de contingencia de las variables categóricas RT y Balance de carga de la hemoglobinopatía.**

		CATEGORIAS DE RT		
		Rápidas	Normales	Lentas
<b>CATEGORIAS CAMBIO DE BALANCE DE CARGA</b>	Hemoglobinopatías de balance neto de carga “más negativo”	125 (99,2%)	0 (0%)	1 (0,8%)
	Hemoglobinopatías de balance neto de carga “más apolar”	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
	Hemoglobinopatías de balance neto de carga “más positivo”	0 (0%)	0 (0%)	36 (100%)

### VI.3 ESTUDIO *IN SILICO*

En el presente trabajo se han caracterizado 12 nuevas variantes de hemoglobina, de las cuales 10 son ocasionadas por mutaciones puntuales mientras que las otras 2 son por delecciones o inserciones de nucleótidos y por este motivo no han podido ser valoradas por los programas informáticos (Tabla XVI).

**Tabla XVI: Resumen de los análisis *in silico* llevados a cabo por PolyPhen-2 y SIFT.**

HEMOGLOBINOPATÍA	ALTERACIÓN	POLYPHEN-2		SIFT		VALORACIÓN
		SCORE	CLASIFICACIÓN	SCORE	CLASIFICACIÓN	
GOYA	del 24pb	---	---	---	---	No valorable
EL RETIRO	ins GTG	---	---	---	---	No valorable
BURGOS	D65N	0,016	Benigna	0,46	Tolerada	Bien clasificada
LA MANCHA	L92R	0,998	Probablemente dañina	0,00	Afecta a la función de la proteína	Mal clasificada por ambos métodos
PUERTA DEL SOL	S50R	0,714	Posiblemente dañina	0,15	Tolerada	Mal clasificada por Poly-Phen 2
EL BONILLO	H46N	0,019	Benigna	0,02	Afecta a la función de la proteína	Mal clasifica por SIFT
CIBELES	G26D	0,999	Probablemente dañina	0,00	Afecta a la función de la proteína	Bien clasificada
CERVANTES	T119I	0,053	Benigna	0,00	Afecta a la función de la proteína	Mal clasificada por Poly-Phen 2
MARAÑÓN	R32G	0,975	Probablemente dañina	0,00	Afecta a la función de la proteína	Bien clasificada
VALDECILLA	M1I	0,999	Probablemente dañina	0,00	Afecta a la función de la proteína	Bien clasificada
GRAN VÍA	M33R	0,924	Probablemente dañina	0,00	Afecta a la función de la proteína	Bien clasificada
MACARENA	P120S	0,143	Benigna	0,01	Afecta a la función de la proteína	Mal clasificada por Poly-Phen 2

El *score* de Polyphen-2 comprende valores entre 0 y 1 siendo éste último valor el más alto y que clasifica las mutaciones desde benignas hasta probablemente dañinas respectivamente.

En el *score* de SIFT los valores están comprendidos entre 1 y 0 de menos a más grave respectivamente (clasificación desde tolerada hasta afecta a la función de la proteína).

## **VII. DISCUSIÓN**





## **VII.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO**

### **VII.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS**

Al analizar los resultados extraídos del presente estudio lo primero que cabría destacar es la limitación más importante del mismo. Los pacientes que han sido analizados proceden de multitud de centros de prácticamente toda la geografía española y han sido valorados por muchos clínicos diferentes. En consecuencia la variabilidad en cuanto a la calidad de la información es muy alta, ya que en algunos casos se dispone de todo tipo de datos demográficos de los pacientes y en otros sólo están disponibles algunas informaciones.

Por ejemplo, existe un porcentaje de 8,44% de sujetos de los cuales se desconoce el sexo, un 22,3% en los que la edad es desconocida e incluso en prácticamente la mitad de los sujetos (48,98%) no se dispone de información acerca de la etnia. Este hecho no invalida los resultados de tipo demográfico pero si limita el alcance que podría tener el estudio.

Esta información ausente en muchos casos, es producto de la sobresaturación de los clínicos, que se ven desbordados a la hora de tener que recoger tanta información de sus pacientes. No obstante, habría que intentar lidiar con este problema ya que es especialmente importante tener todos los datos posibles para enfermedades raras que se estudian en centros de referencia, para así posibilitar el avance en el conocimiento de estas patologías.

### VII.1.1.1 Número de pacientes

En el presente trabajo se han analizado 1.623 pacientes recogidos en 6 años completos (desde 2009 hasta 2014, ambos inclusive). Se observa una tendencia al alza en el número de muestras desde el año 2010 hasta el año 2013, momento en el que se estabiliza el número de pacientes (Figura 19).

Durante estos últimos años ha aumentado la concienciación en el campo de las enfermedades raras, motivo por el cual se han llevado a cabo diversos estudios piloto a nivel de distintas comunidades autónomas con el objetivo de incluir las hemoglobinopatías y talasemias dentro de los planes de *screening* neonatal [68, 69]. Por este motivo presumiblemente han aumentado las peticiones de estudio genético de hemoglobinopatías y talasemias lo que se ve reflejado en la evolución del flujo de muestras recibido.

Por otro lado, el aumento en el número de muestras también puede relacionarse con el mayor seguimiento de los pacientes diabéticos, a los cuales se les monitorizan los niveles de glicemia mediante la determinación de HbA1c (fracción glicada de la hemoglobina) de forma periódica. Durante estas determinaciones se encuentran de forma casual o bien como interferencias de la técnica picos de hemoglobinas anómalas, que *a posteriori*, nos son remitidas para identificar.

### VII.1.1.2 Distribución del sexo en los individuos estudiados

El balance de sexos encontrado en este estudio ha sido equilibrado, de manera que no se pueden destacar diferencias debidas a un desequilibrio entre el sexo de los individuos estudiados.

### VII.1.1.3 Distribución de la edad en los individuos estudiados

La media de edad de los sujetos estudiados es 30,95 años, no obstante, al estratificar la edad de los sujetos se observa que la mayoría de individuos son diagnosticados a edades tempranas (25,1% de los pacientes antes de los 10 años de vida) y esta frecuencia va cayendo paulatinamente a excepción de un pequeño repunte para la cuarta década de la vida (15,9% de los casos diagnosticados con edades comprendidas entre los 31 y los 40 años) (Figura 20).

Este hecho es fácilmente explicable puesto que las formas graves de la enfermedad (*Hidrops fetalis* y Enfermedad de la Hb H) así como parte de las hemoglobinopatías detectadas durante el *screening* neonatal son estudiadas de una forma precoz mientras que, solamente, en las formas clínicamente silentes se demora el diagnóstico.

El repunte de diagnósticos en la cuarta década de la vida coincide con la edad a la que la mayoría de las mujeres españolas tienen su primer hijo [70]. Tras dar a luz a un hijo con anemia microcítica, los padres automáticamente son aconsejados para realizarse un estudio genético en busca de portadores silentes de alfa talasemia.

### VII.1.1.4 Distribución de la etnia en los individuos estudiados

En el 50% de los pacientes se ha podido contar con su origen étnico. Se ha encontrado un porcentaje mayoritario de caucásicos (77,5%) lo que se corresponde con la población mayoritaria residente en España (Figura 21).

A continuación destacan los asiáticos (7,4%), los subsaharianos (5,3%), los magrebís (4,8%) y en menor medida los latinoamericanos (2,7%). Según datos a 31 de diciembre de 2014 del Ministerio de Empleo y Seguridad Social los grupos mayoritarios de extranjeros residentes en España son 2.372.490 ciudadanos de la Unión Europea (5,11%), 1.031.612 africanos (2,22%), 909.909 latinoamericanos (1,96%) y 382.590

## DISCUSIÓN

asiáticos (0,82%) [71]. Según los datos del Ministerio de Empleo y Seguridad Social los africanos son el segundo grupo de extranjeros residentes en España en frecuencia, lo que concuerda con que tanto los magrebís como los subsaharianos estén ampliamente distribuidos en la población estudiada, a pesar de que estos últimos no proceden de zonas endémicas para la  $\alpha$ -talasemia.

Por otro lado, los latinoamericanos son minoritarios en este estudio puesto que proceden de zonas geográficas con menor incidencia de estas patologías a pesar de ser un grupo de extranjeros muy representado en España. El caso contrario serían los asiáticos que proceden de zonas endémicas para la  $\alpha$ -talasemia [6, 44].

### **VII.1.1.5 Lugar de residencia de los individuos de estudio**

En el estudio desglosado por Comunidades Autónomas destacan las frecuencias obtenidas en Madrid (49,7%), Castilla La Mancha (14,8%), Castilla y León (9,5%), Andalucía (7,9%) y País Vasco (5,6%) (Figura 22). Estas 5 regiones se encuentran entre las 9 más pobladas según el informe del Instituto de Estadística a 1 de enero de 2015 [70] y por lo tanto, es normal que registren frecuencias altas.

Por otro lado tanto en los hospitales de Madrid como en los de Castilla La Mancha y Castilla y León actualmente están ejerciendo clínicos que se formaron como especialistas en el Hospital Clínico San Carlos y que en consecuencia, han tenido una fuerte impronta a la hora de reconocer pacientes con características ligeras de estas patologías. Por otro lado, los clínicos de atención primaria cada vez conocen más la enfermedad y piensan más en ella y en consecuencia, identifican cada día a más pacientes con sospecha de padecer este tipo de dolencias.

Entre las comunidades con menores frecuencias a pesar de su población destacan Cataluña (0,4%) y Valencia (0,4%): este hecho es debido a que sus pacientes son

derivados mayoritariamente a centros catalanes como el Hospital Clinic de Barcelona y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

### VII.1.2 DATOS DE DIAGNÓSTICO

En el presente estudio se han recogido todos los pacientes con alteraciones en el *cluster* de los genes  $\alpha$ . Las  $\alpha$ -talasemias suponen casi 10 veces más que las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  encontradas. Presumiblemente este hecho es debido a que la mayoría de las hemoglobinopatías estructurales son clínicamente silentes y en muchos casos se han hallado de forma casual lo que contrasta con la gravedad de algunas formas de  $\alpha$ -talasemia, motivo por el cual estas últimas se han estudiado en un mayor espectro de población.

Si se pone el foco en los casos de  $\alpha$ -talasemias, se han encontrado, 1.282 casos (87,2%) de  $\alpha$ -talasemias delección, 172 casos (11,7%) de  $\alpha$ -talasemias no delección y 16 individuos (1,1%) con  $\alpha$ -talasemias delección y no delección simultáneamente (Figura 23). Esto supone aproximadamente un 12% de  $\alpha$ -talasemia no delección, que tradicionalmente ha sido incluida como causa molecular de  $\alpha$ -talasemia muy poco frecuente, generalmente se hablaba de frecuencias de entre el 5 y el 10%.

Por ejemplo, en un reciente estudio de un grupo malasio, tan sólo encontraron un 4% de  $\alpha$ -talasemia no delección en su población [72], un 3% en el publicado por E. Borges et al en Brasil [73]. En Argentina se calculó en un 8,5% [74] y un estudio de la Dra. Villegas y la Dra. Roperó entre 2001 y 2003 lo estableció en un 7,7% [67]. Estos datos son notablemente inferiores a los encontrados en nuestro trabajo, probablemente porque aquí se ha utilizado la secuenciación en lugar de métodos basados en PCR que tan sólo permiten buscar unas pocas mutaciones ya conocidas.

### VII.1.2.1 Diagnóstico clínico de los individuos de estudio

El diagnóstico de  $\alpha$ -talasemia y hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  han sido desglosados en 4 diagnósticos clínicos cada uno de ellos respectivamente.

Dentro de los diagnósticos clínicos de  $\alpha$ -talasemia tan sólo se han contabilizado 19 casos graves (1 *Hidrops fetalis* y 18 casos de enfermedad de la Hb H), 1.200 Rasgos talasémicos y 160 Portadores silentes. Existen 91 casos de pacientes con alfa talasemia que no están englobados en ningún diagnóstico clínico al no disponer de estudio hematimétrico que permita la clasificación clínica de los mismos. Algunos de ellos tienen datos hematimétricos del hospital de origen pero no han sido utilizados para este trabajo con el objetivo de que todos los parámetros estudiados se hayan hecho de forma uniforme, razón por la cual sólo se han tenido en cuenta los datos obtenidos en nuestro centro.

Los casos graves son tan poco frecuentes porque a día de hoy está bastante extendido el diagnóstico prenatal y el consejo genético en parejas de riesgo, lo que evita nacimientos con las formas graves de la enfermedad y porque además estos diagnósticos clínicos son más abundantes en población asiática que tienen una mayor prevalencia de  $\alpha$ -talasemia debida a determinantes  $\alpha^0$  como las delecciones --SEA y --FIL [72, 74].

Por otro lado, también llama la atención la poca frecuencia de portadores silentes, pero es fácil de entender que este dato está fuertemente infraestimado, puesto que estos pacientes se caracterizan por ausencia de clínica y ausencia de alteraciones hematológicas. En estos casos, los pacientes sólo son diagnosticados a consecuencia de estudios familiares a partir de un miembro afecto.

Por lo que respecta a las hemoglobinopatías estructurales, sólo destacan 2 casos de hemoglobinopatías con baja afinidad por el oxígeno y 1 caso de hemoglobina M que son los únicos pacientes con sintomatología, mientras que los 150 restantes son

hemoglobinopatías silentes que han sido diagnosticados de forma casual, al encontrarse alteraciones en otras analíticas como en la determinación de hemoglobina glicosilada en el seguimiento de los pacientes diabéticos. Los restantes 23 pacientes son hemoglobinopatías estructurales silentes asociadas simultáneamente con alfa talasemia.

#### **VII.1.2.2 Diagnóstico genético de los individuos de estudio**

##### **A) Alfa talasemia delección**

Se han encontrado 1.298 individuos portadores de  $\alpha$ -talasemia delección, de los cuales 905 fueron portadores heterocigotos, 366 homocigotos y 27 dobles heterocigotos (Tabla IV). En los dobles heterocigotos, 26 casos son diferentes combinaciones de la delección de 3,7Kb con otras delecciones tanto  $\alpha^0$  (16 pacientes) como  $\alpha^+$  (10 casos). El último caso sería un heterocigoto compuesto para 2 delecciones  $\alpha^0$  (se corresponde con el paciente del *Hidrops fetalis*).

En los casos homocigotos y en los heterocigotos la delección más frecuente es la 3,7Kb representando un 28,1% y 58,5% del total respectivamente, lo que concuerda con las descripciones previas de otros grupos en poblaciones mediterráneas como en Italia y Grecia [75]. Dentro de los casos heterocigotos le sigue la delección --SEA y --FIL, con un 5,5% y 1,5% del total respectivamente, que son mutaciones muy comunes en el sudeste asiático [76] y que es nuestro grupo poblacional mayoritario por detrás de los caucásicos.



### **B) Alfa talasemia no delección**

Se han encontrado 188 pacientes portadores de  $\alpha$ -talasemia no delección, de los cuales 185 fueron heterocigotos y 3 homocigotos (Tabla V). Entre los homocigotos se observaron 2 casos de Hb Agrinio y 1 de la mutación Hph. La Hb Agrinio fue inicialmente descrita en 3 individuos de origen greco-chipriota con enfermedad de la Hb H y es relativamente frecuente en esa área [32]. La Hb Agrinio supone un 6,3% de los casos de alfa talasemia no delección encontrados en nuestra población y la mayoría se hallan en miembros de la etnia gitana que posiblemente tengan ancestros en común con los gitanos del este del continente europeo.

Los 2 casos homocigotos de este estudio además se comportan como en otras descripciones anteriores, manifestando una enfermedad de la Hb H [77]. A pesar de no encontrarse esta alteración entre las 3 más frecuentes en nuestro medio, es en la que se han hallado más casos homocigotos. Este hecho se explica puesto que estos individuos proceden de familias de etnia gitana con un alto grado de consanguineidad. Nuestros casos proceden de 3 familias no relacionadas, una de Cataluña, otra de Madrid y otra de Andalucía.

En la Hb Agrinio se produce un intercambio de Leu por Pro en la posición 29, la cual contiene un residuo altamente conservado en la evolución que es fundamental para mantener el entorno hidrofóbico necesario para la unión distal del grupo hemo. Al presentarse este cambio, la cadena de globina formada es altamente inestable y se produce la precipitación postraducional de una manera rápida antes de la formación de los dímeros  $\alpha/\beta$  lo que resulta en una expresión fenotípica de  $\alpha$ -talasemia [77].

En todos los casos donde un residuo de Leu es intercambiado por una Pro se genera una hemoglobina inestable. Algunos ejemplos serían la Hb Port Phillip [ $\alpha$

CD91(FG3)Leu>Pro], Hb Quong Sze [ $\alpha$  CD125(H8)Leu>Pro], o la Hb Tunis-Bizerte [ $\alpha$  CD129(H12)Leu>Pro] [22, 32].

En este estudio se han localizado 36 alteraciones responsables de  $\alpha$ -talasemia no deleción diferentes, lo que revela la alta heterogeneidad en la población analizada, no obstante, la mutación más frecuente (Hph) supone un 34,6% de los pacientes. Esta mutación se encuentra ampliamente representada en diversas poblaciones mediterráneas [22, 44] como por ejemplo en Líbano (37%), Jordania (27%) o Israel (11,1%) [75].

La mutación conocida como Hph es una deleción de cinco nucleótidos en el extremo 5' del primer intrón. Esta alteración interfiere en el procesamiento normal a nivel del corte y empalme del ARNm procedente del gen  $\alpha_2$ . La mutación fue descrita por primera vez en un paciente italiano en 1981 y debe su nombre a la abolición de un punto de corte para la enzima de restricción Hph I en el gen  $\alpha_2$  [51].

Además, si tenemos en cuenta las frecuencias acumuladas, más de la mitad de los casos de  $\alpha$ -talasemia no deleción en nuestra población se deben a tan sólo 2 mutaciones, la Hph y la Hb Groene Hart. Alrededor del 75% de la  $\alpha$ -talasemia no deleción es debida a sólo 7 alteraciones moleculares: Hph, Hb Groene Hart, Hb Plasencia, Hb Agrinio, 3'UTR +778, Nco y T-Saudí. Tradicionalmente la mutación Nco ha sido considerada como una de las más frecuentes en nuestro entorno [67] pero en este estudio queda relegada a una 6ª posición en frecuencia.

En los resultados llama poderosamente la atención la frecuencia de la Hb Groene Hart (20,7%) que tradicionalmente había sido asociada con la población magrebí pero que en el presente estudio hemos encontrado también en población autóctona [22, 29]. Esta mutación probablemente se encuentra en nuestra población puesto que durante la Edad Media los habitantes de la península Ibérica estuvieron en contacto durante casi

## DISCUSIÓN

800 años con los árabes procedentes del Magreb, que de este modo dejaron descendencia en la península.

La Hb Groene Hart es una variante estructural que tiene una alteración a nivel de la hélice H de la cadena  $\alpha$  de globina. Esta zona es un área de contacto con la chaperona AHSP. La chaperona se sintetiza a niveles altos en los precursores eritroides y actúa previniendo la precipitación de las cadenas  $\alpha$  de globina. En ausencia de la AHSP las cadenas  $\alpha$  de globina se oxidan y precipitan en los precursores eritroides de la médula originando apoptosis y eritropoyesis ineficaz. En consecuencia, en la Hb Groene Hart la unión con la chaperona se ve alterada y se genera un síndrome  $\alpha$ -talasémico [78].

La Hb Plasencia sería la siguiente alteración por frecuencia (7,4%) aunque a bastante distancia de las anteriores. Esta alteración fue descrita por el grupo de la Dra. Villegas en 2005 en una familia originaria de Plasencia [34] y posteriormente se ha encontrado como segunda causa de  $\alpha$ -talasemia tras la delección de 3,7Kb en Portugal [79]. En esta hemoglobinopatía se sustituye una Leu por una Arg en el residuo 8 de la hélice H, que es una zona de contacto con la chaperona AHSP, por lo tanto, la variante se comporta como inestable y da lugar a un fenotipo de talasemia.

Por último, destacar que en este estudio han sido descritas 9 alteraciones nuevas responsables de  $\alpha$ -talasemia no delección; 7 de las cuales se encuentran actualmente publicadas: Hb Cibeles [31], Hb Cervantes y Hb Marañón [80] y Hb Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena y Hb El Retiro [81]. Las 2 restantes (3'UTR +778 y Hb Clinic de alfa2) aún no han sido publicadas.

En la Hb Cibeles [ $\alpha_2$  CD25(B6)Gly>Asp], una Gly (aminoácido apolar) es remplazada por un Asp (polar de carga negativa). En este residuo no existen alteraciones descritas hasta la actualidad y por ello la comparación se realiza con mutaciones en los aminoácidos colindantes. En estos, también existen cambios de aminoácidos apolares

por otros con carga [Hb Luxembourg (Tyr24His) y Hb Shenyang (Ala26Glu)]. En ambos casos se ven alterados residuos que durante el plegamiento para formar la estructura terciaria de la proteína quedan en el interior de la molécula. Con el cambio de polaridad, como ocurre en la Hb Cibeles, se impide el correcto plegamiento proteico para formar la estructura terciaria lo que origina una hemoglobinopatía que se comporta como inestable y que da lugar a un síndrome  $\alpha$ -talasémico no deleción [31, 82, 83].

En el caso de la Hb Cervantes [ $\alpha_2$  CD118(H1)Thr>Ile], se postula un mecanismo de actuación similar al de la Hb Groene Hart, ya que también se encuentra afectado un residuo de la hélice H. El fenotipo talasémico sería resultado de una disminución de la afinidad de esta variante por la AHSP. Por otro lado, en la Hb Marañón [ $\alpha_2$  CD31(B12)Arg>Gly], la inestabilidad sería debida a la sustitución de un aminoácido en una zona clave para mantener el entorno hidrofóbico necesario para la unión distal con el grupo hemo como ocurría en el caso de la Hb Agrinio [80].

La Hb Valdecilla [ $\alpha_2$  Cdi Met>Ile] es una mutación responsable de una  $\alpha^+$ -talasemia. Esta alteración impide el inicio de la traducción [81]. En la Hb Gran Vía [ $\alpha_2$  CD32(B13)Met>Arg] la inestabilidad podría deberse al cambio de un aminoácido apolar (Met) por uno polar de carga positiva (Arg) en la posición 13 de la hélice B de la cadena de globina  $\alpha$ , lo que altera la secuencia de 6 residuos (CD30-CD35) involucrados en el contacto entre las subunidades  $\alpha_1/\beta_1$  en el tetrámero de hemoglobina como en el caso de la Hb Ámsterdam [84]. Otra hipótesis alternativa sería la que se describe para la Hb Queens Park en la que también se ve afectado el aminoácido 32. Esta posición se encuentra muy próxima al sitio donador del primer intrón y pudiera ser que la mutación altere la función de este sitio originando un *splicing* erróneo [85].

En la Hb Macarena [ $\alpha_2$  CD119(H2)Pro>Ser] se encuentra afectado el residuo 119 en la hélice H de la cadena de globina  $\alpha$  que tiene un papel clave en la interacción

## DISCUSIÓN

con la chaperona AHSP para estabilizar la cadena de globina. Esta misma alteración se ha descrito en el gen  $\alpha_1$  pero con una menor repercusión clínica debida a la menor expresión de este último gen [81]. La Hb El Retiro [ $\alpha_2$  CD120/121(H3/H4) (+Val)] es el resultado de una duplicación en la hélice H. Algunas secuencias repetidas son el resultado de un incorrecto apareamiento cuando la cadena de ADN está mellada y posteriormente el ADN dañado puede ser reparado usando la hebra complementaria como molde. Este mecanismo ha sido propuesto para explicar la inclusión de 3 residuos en la Hb Grady [Glu-Phe-Thr ins entre CD118(H1) y 119(H2)  $\alpha$ ] y 5 residuos en la Hb Zaire [His-Leu-Pro-Ala-Glu ins entre CD116(GH4) y 117(GH5)  $\alpha$ ] y podría ser similar para la Hb El Retiro [24].

Por lo que respecta a las 2 mutaciones aún sin publicar, la Hb Clinic de alfa2 (es la misma alteración que la Hb Clinic pero en este caso encontrada en el gen  $\alpha_2$ ) se trata de una delección de 3pb que conlleva la pérdida de un único codon en la posición 60 o 61 correspondiente a una Lys. La desaparición de un aminoácido en esa posición perturba la región de contacto entre las hélices B y E, afectando a la estabilidad global de la molécula y ocasiona un fenotipo de alfa talasemia. En el caso de esta mutación el fenotipo es más grave que para la Hb Clinic ya que se ve afectado el gen  $\alpha_2$  que es el que tiene mayor expresión [86].

Por otro lado, la región 3'UTR tiene una gran importancia para la estabilidad del ARNm, que es un determinante crítico de la función normal y la traducción de proteínas. Esta región es una secuencia rica en citosinas constituida por una secuencia llamada “Sitio mínimo de unión del Complejo  $\alpha$ ” ( $\alpha$ RNAmin). La unión de diversas ribonucleoproteínas de forma específica a estas secuencias estabiliza el ARNm por lo que su delección se ha asociado a una reducción en la síntesis de cadena alfa. La supresión de un solo nucleótido desde cualquier extremo de  $\alpha$ RNAmin reduce

drásticamente su unión con las ribonucleoproteínas y por tanto la formación del complejo alfa. En este caso la mutación C>A en el nt 778 (3'UTR + 778) dentro de este complejo  $\alpha$ RNAmin dificulta la unión de proteínas y origina inestabilidad del mensajero provocando la disminución de la síntesis de las cadenas de globina, lo que desemboca en una alfa-talasemia.

### **C) Hemoglobinopatías estructurales**

Se han encontrado 176 pacientes portadores de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , de los cuales 173 fueron heterocigotos y 3 homocigotos. Entre los homocigotos se observaron 1 caso de Hb Le Lamentin, 1 de Hb J-París y 1 de Hb Burgos (Tabla VI).

En este estudio se han localizado 35 alteraciones responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  diferentes, no obstante, la mutación más frecuente (Hb Le Lamentín) supone un 25% de los pacientes y la segunda (Hb J-París) un 20%. Si sumamos la frecuencia de las tres primeras (Hb Le Lamentín, Hb J-París y la Hb J-Camagüey) ya suponen la mitad de los casos. Más del 75% de las hemoglobinopatías estructurales son debidas a 9 alteraciones moleculares: Hb Le Lamentin, Hb J-París, Hb J-Camagüey, Hb G-Philadelphia, Hb Nunobiki, Hb El Bonillo, Hb J-Pontoise, Hb Beziars, Hb Setif, y Hb Burgos.

La Hb Le Lamentín ( $\alpha_2$  CD20(B1)His>Gln) fue descrita por primera vez en 1982 en una familia de color de las Antillas francesas (Isla Martinica) durante un estudio realizado en sangre de cordón. La variante se encontró en el padre y en 2 de sus 3 hijos [87]. Seguidamente se describió en una familia japonesa y una familia española [88]. Posteriormente, fue hallada en un hombre británico de 69 años de forma casual al realizarse un control de hemoglobina glicosilada [30] y actualmente es una alteración

## DISCUSIÓN

muy común en la población analizada. No tiene ninguna repercusión clínica a nivel hematológico, se encuentra al estudiar la hemoglobina glicosilada y se separa porque el balance neto de carga es “más negativo” ya que se elimina un residuo de carga positiva y se sustituye por otro residuo polar pero sin carga.

La Hb J-París ( $\alpha_2$  CD12(A10)Ala>Asp) es una variante denominada rápida, descrita por primera vez en una mujer española y que posteriormente se observó en Portugal, Irán, Yugoslavia e Italia. Es clínicamente silente, y por lo tanto, la asociación con otras variantes no agrava el cuadro clínico [29]. Esta variante se ha encontrado principalmente en Castilla y León y es posible su separación porque el Asp introduce una carga negativa que cambia las propiedades eléctricas de la molécula.

El primer caso de la Hb J-Camagüey ( $\alpha_2$  CD141(HC3)Arg>Gly) fue publicado en el año 1978 en una familia cubana de origen español. Posteriormente se ha descrito en otras 3 familias de origen español y en 2 familias en China y Australia, en la última de ellas asociada a una alfa<sup>0</sup> talasemia [89]. En nuestro estudio ha sido la tercera alteración más frecuente lo que es consistente con que las primeras descripciones de esta hemoglobinopatía se realizaron en familias de origen español. Esta variante no muestra manifestaciones clínicas y es posible su separación gracias a la eliminación de una carga positiva procedente de la Arg.

La cuarta mutación en frecuencia es la Hb G-Philadelphia ( $\alpha_2$  CD68(E17)Asn>Lys) de la que se han registrado 10 casos, todos en individuos de raza negra. No obstante, en la literatura se han observado 3 modalidades para esta alteración: AAC>AAG en el codon 68 del gen híbrido formado por la delección de 3,7Kb en población negra, AAC>AAA en el codon 68 del gen  $\alpha_2$  en población caucásica y AAC>AAG en el codon 68 del gen  $\alpha_2$  en Cerdeña. En todos los casos el cambio de aminoácido como resultado de la alteración genética es el mismo (Asn>Lys) [90, 91].

En nuestra cohorte de pacientes todos los casos corresponden con la alteración AAC>AAG en el gen híbrido formado por la delección de 3,7Kb. La Lys introduce una carga positiva que permite la separación de esta hemoglobinopatía.

La Hb Nunobiki ( $\alpha$  CD141(HC3)Arg>Cys) fue descrita por primera vez en 1985 en un varón japonés. Once años después se registró un segundo caso en una mujer belga sin antecesores japoneses [92, 93]. En nuestro trabajo hemos encontrado 9 pacientes portadores de esta hemoglobinopatía todos procedentes de Sevilla salvo uno. Supone la 5ª mutación en frecuencia. Si nos remontamos al Siglo XVII, entre los años 1613 y 1620 el Samurái Hasekura Rokuemon Tsunenaga dirigió una misión diplomática con destino a Europa utilizando el puerto fluvial de Sevilla. Al finalizar la misión diplomática parte de la expedición se quedó en Andalucía asentándose en Sevilla y probablemente sean los antecesores de los casos encontrados actualmente [94].

La Hb El Bonillo ( $\alpha_1$  CD45(CE3)His>Asn), es la sexta alteración a nivel de su frecuencia pero habría que destacar la peculiaridad de que los 8 pacientes portadores de esta hemoglobinopatía son todos oriundos de una región albaceteña muy concreta en torno al término municipal de El Bonillo de modo que parece una mutación circunscrita a ese municipio y sus habitantes. La His es un aminoácido polar de carga positiva que se encuentra en la fracción externa de la molécula de globina y en esta alteración es reemplazada por la Asn que es polar pero sin carga, por lo tanto, el balance global de carga en la superficie se vuelve más negativo y la hemoglobinopatía es capaz de separarse como una variante rápida, con un RT inferior a los 2 minutos por HPLC de intercambio iónico.

Por último, destacar que en este estudio han sido descritas 5 alteraciones nuevas responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ ; 4 de las cuales han sido



## DISCUSIÓN

ya publicadas: Hb Burgos [95], Hb La Mancha y Hb Goya [80] y Hb Puerta del Sol [81]. La Hb El Bonillo está en trámites.

La Hb Burgos ( $\alpha_1$  CD64(E13)Asp>Asn) fue detectada en 4 pacientes diabéticos originarios de Navarra, Madrid y Burgos al realizarse un control de HbA1c. El análisis de las Hb mediante HPLC de intercambio iónico reveló la existencia de un pico en la ventana de la Hb S que comporta entre el 13 y el 34,3%, mientras que por electroforesis capilar zonal se obtuvo un pico en Z6. La variante recibió su nombre por la procedencia del primer paciente. En 3 de los pacientes esta mutación fue identificada en heterocigosis, y en el cuarto, en estado homocigoto. El residuo afectado se encuentra en la superficie externa de la molécula (hélice E13), facilitando su separación mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas, ya que el cambio del aminoácido Asp por Asn hace que la molécula sea más catódica que la Hb A [95].

La Hb La Mancha ( $\alpha_2$  CD91(FG3)Leu>Arg) es clínicamente silente y fue encontrada en un varón de 52 años natural de Albacete durante un control de diabetes mediante la determinación de hemoglobina glicosilada. La variante presentaba un RT de 4,19 minutos por HPLC de intercambio iónico y se separaba por electroforesis capilar en Z6. También se eluyó un pico anómalo por HPLC de fase reversa. La movilidad de la Hb La Mancha se encuentra afectada como resultado de un cambio de aminoácido apolar por otro polar de carga positiva [80].

La Hb Goya [ $\alpha_2$  CD51(CE9)–CD58(E7) (–24pb)] muestra un patrón de movilidad electroforética alterado (variante rápida) y tiene una afinidad por el O<sub>2</sub> disminuida. Fue hallada en un niño de 2 años que presentaba saturaciones de oxígeno bajas (87-92%) sin patología cardíaca o pulmonar. Su padre también presentaba los mismos patrones de saturación pero declinó a realizarse el estudio. La variante se separó a un RT de 1,35 minutos por HPLC de intercambio iónico y en Z12 por electroforesis

capilar. Se eluyeron 3 picos por HPLC de fase reversa ( $\beta^A$ ,  $\alpha^A$  y  $\alpha^X$ ). La saturación de oxígeno disminuida probablemente se deba a que la His distal (E7) se encuentra comprometida en esta variante [80].

Por lo que respecta a la Hb Puerta del Sol ( $\alpha_1$  CD49(CE7)Ser>Arg), fue encontrada en 3 individuos de 2 familias no relacionadas. Un individuo era procedente de Rumanía y el hallazgo de la variante fue casual coincidiendo con un control de diabetes. Los otros 2 individuos son hermanos, originarios de Madrid, en los cuales se encontró la variante durante el programa de cribado de hemoglobinopatías neonatal. Por HPLC de intercambio iónico se obtuvo un pico a un RT de 4.36-4.47 minutos (similar al RT de la Hb S) y en Z4 por electroforesis capilar. No se eluyeron picos anómalos por HPLC de fase reversa. La separación es posible porque se introduce una carga positiva en un residuo externo que hace que la molécula se separe posteriormente a la Hb A [81].

A continuación, se estudió la mutación mayoritaria y su frecuencia por comunidades autónomas tanto para las  $\alpha$ -talasemias no delección como para las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ .

En el caso de las  $\alpha$ -talasemias no delección, la mutación mayoritaria en Madrid, Castilla y León, Andalucía y Extremadura es la Hph que a nivel global también era la mutación más frecuente y que como se ha comentado, se encuentra ampliamente representada en poblaciones mediterráneas. En el caso de Castilla La Mancha hay un número de casos idéntico entre la Hph y la Hb Groene Hart, mientras que esta última es la alteración más frecuente en País Vasco, Cantabria, Navarra y Canarias (Tabla VII).

En el caso de las hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , la mutación mayoritaria en Madrid es la Hb G-Philadelphia lo que pone de manifiesto que es una de las regiones que más inmigrantes tiene, ya que esta variante se ha registrado precisamente en población subsahariana. Por otro lado, en Castilla La Mancha la

## DISCUSIÓN

variante más frecuente es la Hb Le Lamentin, mientras que en Castilla León y Cantabria es la Hb J-París. En las dos Castillas, la variante más frecuente supone aproximadamente dos tercios del total de casos respectivamente. Probablemente la distribución de la Hb J-París en zonas occidentales tenga que ver con su proximidad a Portugal, ya que en este país también se ha encontrado la presencia de esta variante.

Por otra parte, la Hb Nunobiki es la mutación más representada en Andalucía, especialmente a expensas de los casos registrados en Sevilla como se ha comentado anteriormente.

## VII.2 ESTUDIO COMPARATIVO

### VII.2.1 EDAD

Según las categorías en las que se han dividido los pacientes del estudio, talasémicos, talasémicos y portadores de hemoglobinopatías estructurales y portadores de hemoglobinopatías estructurales, cuando se estudia la edad a la que se realizó el diagnóstico molecular en la población analizada se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con talasemia y los portadores de hemoglobinopatías estructurales (28 años *versus* 67 años), así como para el grupo de pacientes que presentan simultáneamente talasemia y hemoglobinopatías estructurales frente a los que sólo tienen hemoglobinopatías estructurales (28,5 años *versus* 67 años).

Si se analizan en profundidad estos resultados lo primero que habría que tener en cuenta es que, mientras el hecho de tener una talasemia sí tiene una repercusión clínica importante (sobre todo en algunas de sus formas como la enfermedad de la Hb H), generalmente, la mayoría de las hemoglobinopatías estructurales encontradas en este estudio son clínicamente silentes. Este motivo es el que lleva a que de forma

sistemática la edad de diagnóstico en los pacientes con talasemia sea bastante menor ya que suelen empezar a mostrar señales de alarma en algunos parámetros del hemograma tales como el VCM y la HCM.

Por otro lado, existe también una poderosa razón para que los portadores de hemoglobinopatías estructurales sean diagnosticados a edades tardías. Como se ha comentado con anterioridad, la mayoría de las hemoglobinopatías estructurales son clínicamente silentes y por lo tanto, no existe ningún indicador que permita detectarlas salvo algunas determinaciones especiales como la cuantificación de hemoglobina glicada. Este análisis se realiza fundamentalmente a pacientes diabéticos para llevar un adecuado control y seguimiento de la glicemia. Por lo tanto, como la edad de aparición de la Diabetes Mellitus tipo II es tardía, el hallazgo casual de hemoglobinopatías estructurales silentes también lo es.

## VII.2.2 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN TALASEMIAS

### VII.2.2.1 Alfa talasemias

Se han recogido datos de todo el espectro clínico de las alfa talasemias: *Hidrops fetalis*, enfermedad de la Hb H, rasgo talasémico y portadores silentes. Los dos primeros no han podido ser analizados a nivel estadístico debido al bajo número de casos, pero si se observa la gravedad que presentan.

El *Hidrops fetalis* corresponde a la pérdida de los cuatro genes alfa [ $\alpha^0$ -talasemia homocigota (--/--)] o en algunos casos se debe a la herencia de una mutación no deleción severa de un progenitor y una  $\alpha^0$  del otro (--/ $\alpha^T\alpha$ ). Esta forma de  $\alpha$ - talasemia es incompatible con la vida [44]. La muerte se produce de manera precoz intraútero o en el periodo neonatal. Los niveles de hemoglobina al nacimiento oscilan entre 6 y 8 g/dL, con eritroblastosis, incremento de los reticulocitos y marcadas alteraciones morfológicas

## DISCUSIÓN

de la serie roja. La cuantificación de la Hb Bart supera el 80%, que es la única hemoglobina funcional en estos fetos, también se puede observar Hb Portland, y ausencia total de Hb F y de HbA. El estudio de los progenitores debe confirmar que ambos son portadores de una  $\alpha^0$ -talasemia.

La Enfermedad de la Hb H se produce por una falta de función de tres genes  $\alpha$ , como resultado de la herencia de una  $\alpha^+$ -talasemia de uno de los progenitores y una  $\alpha^0$ -talasemia del otro. Es el más severo de los fenotipos de  $\alpha$ -talasemia compatible con la vida. El genotipo más común asociado con la enfermedad de la Hb H es ( $--/-\alpha$ ). Otros genotipos frecuentes son la interacción de la Hb Constant Spring con el determinante  $\alpha^0$ , la coexistencia de una delección  $\alpha^0$  con  $\alpha$ -talasemia no delección ( $--/\alpha^T\alpha$ ) o defecto homocigoto no delección ( $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ). En general el cuadro clínico se manifiesta con una talasemia de curso clínico intermedio, con anemia moderada muy variable, con rangos de concentraciones de hemoglobina muy amplios (2,6 – 13,3g/dL), generalmente inferiores a 10g/dL. [44-46]. Desde el punto de vista hematológico se caracteriza por ser una anemia microcítica (VCM =  $62,36 \pm 5,5$ ) e hipocroma (HCM =  $18,09 \pm 1,1$ ) con marcadas alteraciones morfológicas de los hematíes con poiquilocitosis y dianocitos. Los reticulocitos están aumentados, detectándose cuerpos de inclusión de Hb H en más del 50% de los eritrocitos. El diagnóstico se corrobora mediante técnicas electroforéticas y/o cromatográficas, observándose un pico rápido de Hb H (2-20%) a la que, a veces se suma la Hb Bart. El fenotipo es caracterizado molecularmente.

A continuación, se estudiaron los casos de alfa talasemia delección con 2 genes funcionales según si la delección era  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha$ ) o era  $\alpha^+$  en homocigosis ( $-\alpha/-\alpha$ ). Se observaron diferencias en el VCM (68,4 vs. 72,3), HCM (21,3 vs. 22,8) y RDW (17 vs. 15,7). Los 2 primeros fueron más bajos en el grupo de pacientes con una delección  $\alpha^0$  mientras que el RDW fue más alto en este grupo (Tabla IX).

El VCM más bajo en las deleciones  $\alpha^0$  nos muestra que los portadores de estas alteraciones tienen una microcitosis más marcada. Por lo que respecta al HCM, a valores más bajos existe una mayor hipocromía. Finalmente los RDW altos indican que existen poblaciones eritrocitarias de muy diferentes tamaños y formas (elevada anisocitosis).

Estos parámetros claramente indican que si bien ambos grupos de pacientes tienen 2 genes funcionales, los individuos portadores de deleciones  $\alpha^0$  poseen una hematimetría más severa (presentan más microcitosis, más hipocromía y más anisocitosis) dentro de que todos se comportan a nivel clínico como rasgos talasémicos. Este hecho ya fue evidenciado en un estudio anterior del grupo de la Dra. Villegas [96].

#### **A) 2 genes funcionales**

Los pacientes con 2 genes funcionales se agruparon en función de su genotipo: por un lado el grupo de pacientes con alfa talasemia deleción [ $(--/\alpha\alpha)$  ó  $(-\alpha/-\alpha)$ ], por otro los pacientes con alfa talasemia no deleción [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  ó  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] y por último los pacientes con alfa talasemia deleción y no deleción simultáneamente o grupo mixto  $(-\alpha/\alpha^T\alpha)$ .

Se estudiaron diversos parámetros del hemograma (número de eritrocitos, cifra de hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM, CHCM, RDW y reticulocitos) así como los niveles de Hb A<sub>2</sub> y Hb F. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos para el número de eritrocitos, cifra de hemoglobina, hematocrito, RDW, reticulocitos y porcentaje de Hb F.

Posteriormente se analizaron las variables estadísticamente significativas mediante comparaciones 2 a 2 para conocer cuáles de los grupos son diferentes para cada uno de esos parámetros (Tabla X).

## DISCUSIÓN

Por lo que respecta al número de eritrocitos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones 2 a 2, siendo el grupo mixto ( $-\alpha/\alpha^T\alpha$ ) el que mostró valores más altos ( $6 \times 10^{12}/L$ ), mientras que el grupo de la no delección es el que reveló datos más bajos ( $4,8 \times 10^{12}/L$ ). En realidad, cuando aumenta la gravedad de la talasemia, también aumenta el número de glóbulos rojos, por lo que nuestro resultado es discordante con la literatura probablemente debido al bajo número de casos con mutaciones puntuales (3 individuos) y a la edad de 2 de ellos (inferior a los 20 meses de vida) [74]. Por lo tanto, el número de hematíes no es un buen parámetro.

En cuanto a la cifra de hemoglobina, hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de alfa talasemia delección (12,2g/dL) y el grupo de alfa talasemia no delección (10,8g/dL) y también entre el grupo de alfa talasemia no delección y el grupo mixto (12,9g/dL). Se vuelve a mostrar que el grupo de valores más altos es el mixto y el de valores inferiores el grupo de no delección. Este resultado confirma que la alfa talasemia no delección es más grave que la causada por delecciones ya que la cifra de hemoglobina se va reduciendo con la gravedad [74, 97].

El hematocrito muestra exactamente el mismo comportamiento que la cifra de hemoglobina, una vez más el grupo de la no delección presenta valores más bajos (33,3%).

Para el caso del RDW, tan sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con alfa talasemia delección y el grupo de la no delección, siendo este último grupo el que presenta valores más altos (15,7% vs 17,3%). Es lógico que el RDW sea más elevado en los pacientes con alfa talasemia no delección puesto que es un marcador que permite ver cuán diferentes son las poblaciones eritrocitarias, y a mayor gravedad de la talasemia la anisocitosis será más marcada

(RDW alto) con 2 poblaciones bien diferenciadas (eritrocitos microcíticos e hipocrómicos y eritrocitos normocíticos y normocrómicos).

Por otro lado, el número de reticulocitos fue diferente a nivel estadístico tanto para la comparación entre el grupo no deleción con el deleción como para la comparación entre no deleción y el grupo mixto. Vuelve a tomar los valores más altos el grupo de la no deleción.

Los resultados muestran que el grupo de pacientes con 2 genes funcionales y que presentan alfa talasemia no deleción  $[(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  ó  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)]$  tienen parámetros hematimétricos más graves: Hb y hematocrito más bajos y RDW y reticulocitos más altos. Por el contrario se observa un número de hematíes más bajo, aunque posiblemente este valor no sea el correcto. También se ve un VCM más bajo en este grupo a pesar de no haberse alcanzado la significación a nivel estadístico. No obstante, las diferencias con el resto de grupos podrían ser incluso más grandes, puesto que uno de los casos había recibido una transfusión los días previos a la extracción de la muestra para el presente estudio. Por la misma razón, sumada al bajo tamaño muestral de los pacientes no deleción, es probable que tanto el HCM como el CHCM estén artificialmente altos en este grupo y que por ese motivo no se encuentren diferencias a nivel estadístico como cabría esperar, ya que los pacientes con 2 genes funcionales por mutaciones puntuales deberían mostrar valores más bajos para estos parámetros [74].

De modo que los pacientes con ausencia de 2 genes  $\alpha$ , por causa de mutaciones puntuales, muestran un fenotipo más grave, pareciéndose más a una enfermedad de la Hb H que a un rasgo talasémico a nivel clínico. Por lo tanto, se podría postular que la  $\alpha$ -talasemia no deleción es más grave que la  $\alpha$ -talasemia deleción como se ha observado en diversos estudios previos [17, 98]. Además, se observó que estos casos de alfa talasemia no deleción se debían mayoritariamente a mutaciones en el gen  $\alpha_2$ , como en



## DISCUSIÓN

nuestros casos, los 3 pacientes presentaron mutaciones en el gen  $\alpha_2$  en homocigosis (1 caso de Hph y 2 casos de Hb Agrinio).

Finalmente, el porcentaje de Hb F fue diferente a nivel estadístico para las dos comparaciones que incluyeron al grupo de la no delección. A este respecto cabría destacar el bajo tamaño muestral de este grupo que hace que cualquier variación de un individuo arrastre los valores de todo el grupo. En este caso dos de los pacientes tenían menos de 20 meses y por lo tanto, explican los valores elevados de la Hb F.

### **B) 3 genes funcionales**

Los pacientes fueron divididos en 2 categorías atendiendo a si la mutación responsable de alfa talasemia era puntual ( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ) o una delección ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) y a continuación se compararon los parámetros hematimétricos así como los niveles de Hb A<sub>2</sub> y Hb F entre ambos grupos (Tabla XI).

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el número de eritrocitos, el VCM, el HCM y los niveles de Hb A<sub>2</sub> a pesar de que los valores de estos parámetros para ambos grupos son semejantes. El número de eritrocitos fue más elevado en el grupo de la no delección y tanto el VCM como el HCM fueron más bajos. Por lo tanto, nos indican que la alfa talasemia debida a mutaciones puntuales tiene una mayor repercusión clínica como ya se había observado en anteriores estudios [74, 97].

### VII.2.2.2 Alfa talasemia no delección

Los pacientes con alfa talasemia no delección y 3 genes funcionales (alfa talasemia no delección heterocigota) fueron divididos en 2 grupos atendiendo a si la mutación se encuentra en el gen  $\alpha_2$  o en el gen  $\alpha_1$ . En estos pacientes se ha realizado la comparación de los parámetros hematimétricos así como de los niveles de Hb A<sub>2</sub> y Hb F.

Se alcanzaron diferencias a nivel estadístico para el número de hematíes (5,37 vs. 5,28), el HCM (24,5 vs. 26), el CHCM (31,9 vs. 32,7) y los niveles de Hb A<sub>2</sub> (2,7 vs. 2,85). Por otro lado, a pesar de no obtener un nivel de significación aceptable, se observó una tendencia a la significación para el VCM (77,32 vs. 79,38) y el RDW (15 vs. 14,3) (Tabla XII).

El número de glóbulos rojos y el RDW fueron más altos en el grupo de pacientes con mutaciones en el gen  $\alpha_2$ , mientras que el VCM, el HCM, el CHCM y los niveles de Hb A<sub>2</sub> fueron más bajos en este grupo. Por lo tanto, todos los parámetros indican que los pacientes con mutaciones en el gen  $\alpha_2$  muestran un fenotipo ligeramente más severo. Este hecho es fácilmente explicable por el patrón de expresión de ambos genes  $\alpha$ . Como ya se ha comentado con amplitud el gen  $\alpha_2$  se expresa aproximadamente 2,6 veces con más intensidad que el gen  $\alpha_1$ , tanto en células fetales como en adultas, y en consecuencia las mutaciones que afectan al primero tienen una mayor repercusión a nivel hematológico [2].

### VII.2.3 DATOS HEMATIMÉTRICOS EN HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Se han encontrado 35 hemoglobinopatías estructurales de cadena alfa diferentes en este estudio. Se han analizado los parámetros hematimétricos de cada grupo así como los niveles de Hb A<sub>2</sub>, Hb F, Hb X, RT y posición EZ.

La mayoría de grupos están compuestos por un único individuo, por lo que los valores son los correspondientes al mismo en lugar de una media, y por tanto, los parámetros hematimétricos no son muy representativos para compararlos entre sí. Además, 32 de las hemoglobinopatías halladas son clínicamente silentes y los parámetros hematológicos no se ven afectados, situándose en el rango de la normalidad. Las únicas variantes con clínica son la Hb M-Boston, la Hb Goya y la Hb Titusville (Tabla XIII).

Por lo que respecta a los niveles de Hb A<sub>2</sub>, estos varían desde el 0,6% hasta el 3,5%. Es destacable, los valores tan bajos de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\gamma_2$ ) encontrados en algunos pacientes, que no son valores reales, ya que al estar estudiando portadores de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , la Hb A<sub>2</sub> se forma tanto a partir de las cadenas  $\alpha$  normales [Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\gamma_2$ )] como de las cadenas  $\alpha$  mutadas [Hb A<sub>2</sub>' ( $\alpha^x_2\gamma_2$ )].

Algunas variantes de la Hb A<sub>2</sub>' son fáciles de identificar mediante técnicas cromatográficas y/o electroforéticas, porque los cambios que las han originado modifican sus propiedades eléctricas favoreciendo su separación, mientras que en otras estos cambios no permiten su detección y por lo tanto no pueden ser cuantificadas: esto puede ser debido a que migre bajo la fracción de la Hb A si la sustitución de aminoácido causa la pérdida de una carga positiva o ganancia de una negativa; mientras que si el

cambio es al contrario, podría retrasarse la elución del segundo pico de Hb A<sub>2</sub> hasta el final del proceso.

Por otro lado, los niveles elevados de Hb F (varían entre el 0% y el 7,2%) se explican ya que algunos pacientes además de la hemoglobinopatía estructural de cadena  $\alpha$  poseen otras patologías que producen una elevación de la Hb F como es la persistencia hereditaria de Hb F (PHHF).

En cuanto al gran rango encontrado para el porcentaje de Hb X (6,2-54,5%), cabe destacar varias condiciones que están diversificando este rango. Por un lado, los porcentajes muy bajos son debidos a que algunas hemoglobinopatías pueden ser ligeramente inestables lo que ocasiona su precipitación temprana y por tanto la no detección de la totalidad de la variante.

Por otro lado, también está actuando una graduación natural que tiene que ver con los niveles de expresión diferencial de los genes  $\alpha$ . Las variantes debidas a mutaciones en el gen  $\alpha_1$  tendrán una menor expresión que las variantes ocasionadas por mutaciones en el gen  $\alpha_2$ . Por último, los valores extremos por el lado alto, corresponden a los casos homocigotos para los portadores de estas variantes.

Por lo que respecta a las hemoglobinopatías con repercusión clínica, en el caso de la hemoglobinopatía M-Boston, se observa un número de hematíes elevado, cifra de hemoglobina y hematocrito altos. Estos valores demuestran que el paciente presenta poliglobulia. En la Hb M-Boston se encuentra alterada la histidina distal (E7) que está sustituida por tirosina. Este tipo de hemoglobina se encuentra oxidada de forma irreversible y por tanto, no puede aportar oxígeno a los tejidos originando cianosis [22, 99].

La clínica de estos pacientes se agrava a medida que aumentan los niveles de Hb M, así por ejemplo, para valores de hasta sólo el 15%, como ocurre en este paciente, se

## DISCUSIÓN

observa únicamente una pigmentación grisácea en la piel. Para valores de entre el 20 y el 30% de Hb M aparecen síntomas neurológicos y cardiovasculares (mareos, dolor de cabeza, ansiedad, disnea, síntomas de bajo gasto cardíaco, somnolencia y convulsiones). Niveles cercanos al 70% son letales [41]. Los pacientes con Hb M congénita desarrollan adaptaciones fisiológicas y pueden tolerar niveles elevados (por encima del 40%) sin síntomas. Estas adaptaciones incluyen cambios en la concentración del 2,3-DPG y pH, síntesis de cadenas de globina y poliglobulia, no obstante, estos pacientes pueden sufrir descompensaciones cuando se exponen a agentes oxidantes de la hemoglobina [41].

La Hb Goya y la Hb Titusville muestran una baja afinidad por el oxígeno. En la Hb Titusville se encuentra afectado el residuo 94 de la cadena  $\alpha$  que tiene un papel importante en las interacciones  $\alpha_1\beta_2$ . Los individuos portadores de esta hemoglobinopatía muestran cianosis [100].

Finalmente, la Hb Goya tiene una delección de 24 pb que afecta a ocho aminoácidos situados en la hélice E de la cadena  $\alpha$  de globina entre los que se encuentra involucrados la His distal (E7). Este hecho se pone de manifiesto en las saturaciones de oxígeno bajas que mostraba el paciente (87-92%) [80].

### VII.2.3.1 Análisis de los porcentajes de hemoglobina por HPLC

Los pacientes fueron divididos en 3 categorías: hemoglobinopatías estructurales homocigotas, hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_2$  y hemoglobinopatías estructurales heterocigotas del gen  $\alpha_1$ .

Se analizaron los porcentajes de Hb A<sub>2</sub>, Hb F y Hb X y tan sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este último. Analizando posteriormente esta variable en comparaciones 2 a 2, en todas ellas se alcanzó la significación estadística (Tabla XIV).

El grupo de homocigotos fue el que mostró los porcentajes de Hb X más altos con una mediana del 47,4%, mientras que el grupo de hemoglobinopatías heterocigotas para el gen  $\alpha_1$  fue en el que se obtuvieron los porcentajes inferiores (mediana de 17%). Como se acaba de comentar, es lógico que las mutaciones en homocigosis expresen mayor cantidad de proteína mutada y también es coherente que debido a la menor expresión del gen  $\alpha_1$ , las hemoglobinopatías que afectan a este gen tengan porcentajes de la hemoglobinopatía inferiores.

Por último, destacar que si bien para el porcentaje de Hb A<sub>2</sub> y Hb F no se obtuvieron diferencias a nivel estadístico, si se observan unas ciertas tendencias. Por ejemplo, para el caso de la Hb A<sub>2</sub> los valores siguen una distribución inversa a los valores de la Hb X. El razonamiento es el siguiente: a mayor expresión de un gen  $\alpha$  mutado, mayor porcentaje de Hb X y de Hb A<sub>2</sub>'. Como la Hb A<sub>2</sub>' no tiene el mismo patrón de separación que la Hb A<sub>2</sub> no es cuantificada y por tanto, ésta última está infraestimada. Luego, a mayor porcentaje de Hb X, menor porcentaje de Hb A<sub>2</sub>. Además el valor de Hb A<sub>2</sub> está por debajo del 2,5% (normalidad) en todos los casos, lo que es debido a la formación de su correspondiente variante de Hb A<sub>2</sub>', que si fuese cuantificada, el valor total sería la normalidad.

Hay que tener en cuenta que este tipo de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ , generalmente presentan niveles bajos de Hb A<sub>2</sub>, por tanto si se heredasen junto a una  $\beta$ -talasemia heterocigota, donde los niveles de Hb A<sub>2</sub> suelen estar aumentados, se podrían normalizar los valores de Hb A<sub>2</sub>, y aumentarían los riesgos de un diagnóstico equivocado.

La Hb F, sigue el mismo patrón en cuanto a expresión que la Hb X, es decir, a mayor cantidad de Hb X, mayor cantidad de Hb F. No obstante, las diferencias entre

## DISCUSIÓN

grupos a pesar de esta tendencia son muy bajas y no parecen responder a ninguna razón biológica.

### VII.2.3.2 Análisis del tiempo de retención

Las hemoglobinas fueron divididas en 3 categorías para el RT: rápidas ( $RT < 2,1$  min), normales ( $2,1 \text{ min} < RT < 3,1 \text{ min}$ ) y lentas ( $RT > 3,1 \text{ min}$ ). Por otro lado, las hemoglobinopatías estructurales fueron divididas en 3 categorías: hemoglobinopatías de balance neto de carga “más negativo”, hemoglobinopatías de balance neto de carga “más positivo” y hemoglobinopatías de balance neto de carga “más apolar”.

Esta última categoría hace referencia al cambio de carga que se produce en la hemoglobina como consecuencia de la mutación. Por ejemplo, si una mutación introduce un aminoácido de carga negativa donde antes había un residuo sin carga o si por el contrario, en una determinada posición había un aminoácido de carga positiva y la mutación lo sustituye por un residuo sin carga, la carga global de la proteína se estará volviendo más negativa.

Las 2 variables (categorías de RT y cambio de balance de carga) se enfrentaron en una tabla de contingencia, obteniéndose una correlación prácticamente al 100% (Tabla XV). Todas las hemoglobinopatías de balance neto de carga “más positivo” son englobadas dentro de la categoría de variantes lentas, todas las hemoglobinopatías de balance neto de carga “más apolar” son las que poseen un RT muy próximo al de la Hb A y todas las hemoglobinopatías de balance neto de carga “más negativo” se clasificarían como variantes rápidas, es decir que se eluyen antes que la Hb A.

Esta correlación podría ser debida a que el método de separación utilizado es el HPLC de intercambio iónico, el cual permite la separación de iones y moléculas polares, basándose en las propiedades de carga de las moléculas. Esta técnica utiliza un

gradiente salino de fuerza iónica creciente, donde la Hb X es separada en base a sus interacciones iónicas con el material de la columna.

No obstante existe una excepción entre las variantes analizadas y es el caso de la Hb M-Boston donde la carga positiva procedente de la His distal es sustituida por un aminoácido aromático (Tyr). El balance de carga en la molécula es hacia más negativo, por lo que debería ser rápidamente eluída de la columna y tener un RT bajo, pero sin embargo, tarda en separarse 4,74 minutos. La peculiaridad de esta hemoglobina es que al no disponer de la histidina distal el hierro de grupo hemo se oxida de ion ferroso a ion férrico de forma irreversible al unirse al oxígeno y por lo tanto, no puede ceder el oxígeno a los tejidos. Quizá el efecto real al mantener el hierro del grupo hemo en su forma oxidada sea finalmente el de un balance de carga hacia más positivo y eso explique porque esta variante se comporta como las otras hemoglobinopatías lentas de este estudio.

### VII.3 ESTUDIO *IN SILICO*

*In silico*, hace referencia al material de que están hechos los semiconductores que permiten almacenar información en el ordenador. La expresión *in silico* fue utilizada por primera vez en 1989 por Pedro Miramontes, matemático de la Universidad Nacional Autónoma de México, para caracterizar experimentos biológicos realizados únicamente en ordenador [101].

Esta expresión intentó cambiarse por la expresión correcta en latín “in silicio” al igual que “in vitro” o “in vivo”. Siempre tuvo más acogida “in silico” y hoy día es un término universal.

Las técnicas informáticas *in silico* son rápidas y rentables, de ahí su aceptación. En medicina, los métodos *in silico* se usan para la predicción y validación de técnicas



## DISCUSIÓN

sobre la salud humana. En nuestro caso se han utilizado dos programas diferentes PolyPhen-2 y SIFT. Ambos realizan una puntuación (*score*) de acuerdo a diversos algoritmos para establecer la probabilidad que tiene una mutación de ser patológica o benigna para la proteína. Es decir, la probabilidad de que la estabilidad o funcionalidad de la proteína se vean alteradas.

En el caso de Polyphen-2 el *score* comprende valores entre 0 y 1 siendo éste último valor el más alto, es decir, valores próximos a 0 serían mutaciones benignas y valores próximos a 1 serían mutaciones probablemente dañinas.

En el *score* de SIFT los valores están comprendidos entre 1 y 0 de menos a más grave respectivamente (clasificación desde mutaciones toleradas hasta aquellas en las que se afecta a la función de la proteína).

El análisis *in silico*, sólo fue realizado en aquellas variantes, no descritas con anterioridad, cuya alteración se debe a mutaciones puntuales (Tabla XVI).

Lo esperable sería que las mutaciones responsables de hemoglobinopatías estructurales clínicamente silentes fueran clasificadas como “benignas” o “toleradas” con *score* cercanos a 0 y 1 por PolyPhen-2 y SIFT respectivamente. Por otro lado, para las mutaciones que originan hemoglobinopatías inestables que cursan con síndromes talasémicos lo deseable sería que fueran catalogadas como “posiblemente dañinas” o “afecta a la función de la proteína” con *score* cercanos a 1 y 0 por PolyPhen-2 y SIFT respectivamente.

Ambos programas clasificaron correctamente 5 hemoglobinopatías: Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Maraón, Hb Valdecilla y Hb Gran Vía. La Hb Burgos es una variante estructural que no tiene ninguna repercusión clínica y que fue hallada en pacientes diabéticos al realizarse la cuantificación de la hemoglobina glicosilada [95] y ambos métodos la clasificaron como benigna. Las otras 4 hemoglobinopatías (Cibeles,

Marañón, Valdecilla y Gran Vía) cursan con microcitosis e hipocromía [31, 80, 81] y los 2 softwares las catalogaron como probablemente dañinas.

Por otro lado PolyPhen-2 clasificó correctamente la Hb El Bonillo en benigna mientras que por SIFT la clasificación fue errónea. En contraposición SIFT acertó con la Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes y Hb Macarena clasificando la primera como tolerada y las otras 2 como función de la proteína afectada, mientras que PolyPhen-2 se equivocó [80, 81].

Finalmente, con la Hb La Mancha que no tiene ningún tipo de repercusión clínica [80] se realizó una predicción errónea por parte de ambos métodos.

En concordancia con estos resultados, podríamos asumir que en nuestras variantes analizadas ha funcionado mejor el algoritmo de SIFT con un porcentaje de aciertos del 80% que el de PolyPhen-2 que sólo alcanzó un porcentaje de aciertos del 60%.



## **VIII. CONCLUSIONES**



Los avances llevados a cabo mediante la realización del presente trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La mayoría de los individuos son diagnosticados a edades tempranas, sobre todo en los casos graves y en las  $\alpha$ -talasemias, predominan los caucásicos y en menor medida los asiáticos.
2. La  $\alpha$ -talasemia no deleción supone un 12% de la  $\alpha$ -talasemia en nuestro medio representando un valor más alto de lo descrito hasta la actualidad.
3. La deleción más frecuente en nuestro entorno fue la 3,7Kb lo que es habitual en poblaciones mediterráneas seguida por las asiáticas --SEA y --FIL. Las alteraciones responsables de  $\alpha$ -talasemia no deleción más representadas son la Hph y la Hb Groene Hart y en el caso de las hemoglobinopatías estructurales la Hb Le Lamentin y la Hb J-París. No obstante, existe una alta heterogeneidad en la población analizada con el hallazgo de 36 y 35 alteraciones diferentes responsables de  $\alpha$ -talasemia no deleción y de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$  respectivamente.
4. Las deleciones  $\alpha^0$  (--/ $\alpha\alpha$ ) tienen una hematimetría más severa que las deleciones  $\alpha^+$  en homocigosis (-/ $\alpha$ - $\alpha$ ). La  $\alpha$ -talasemia no deleción con 2 genes funcionales [ $(\alpha^T\alpha^T/\alpha\alpha)$  ó  $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$ ] tiene parámetros hematimétricos más graves que los mismos genotipos ocasionados por deleciones. La  $\alpha$ -talasemia no deleción es más grave que la  $\alpha$ -talasemia deleción. Los pacientes con mutaciones puntuales en el gen  $\alpha_2$  muestran un fenotipo ligeramente más severo.
5. En este estudio han sido descritas 9 alteraciones nuevas responsables de  $\alpha$ -talasemia no deleción: Hb Cibeles, Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb

## CONCLUSIONES

Gran Vía, Hb Valdecilla, Hb Macarena, Hb El Retiro, 3'UTR +778 y Hb Clinic de  $\alpha_2$ . También se han encontrado 5 alteraciones nuevas responsables de hemoglobinopatías estructurales de cadena  $\alpha$ : Hb Burgos, Hb La Mancha, Hb Goya, Hb Puerta del Sol y Hb El Bonillo.

6. En el análisis *in silico*, ambos programas clasificaron correctamente la Hb Burgos, Hb Cibeles, Hb Marañón, Hb Valdecilla y Hb Gran Vía. Al realizar la clasificación de la Hb El Bonillo, Hb Puerta del Sol, Hb Cervantes, Hb Macarena y Hb La Mancha uno o ambos métodos *in silico* cometieron errores. El mejor algoritmo fue SIFT con un porcentaje de aciertos del 80%.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**





1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Fifth ed. W. H. Freeman and Company. 2008, New York.
2. Villegas A, Ropero P. Capítulo 10: Hemoglobinopatías y alteraciones de los eritrocitos. González JM, Medina JM. *Patología Molecular*. Mc Graw-Hill. Interamericana. 2001, Aravaca (Madrid). p. 171-192.
3. Safo MK, Ahmed MH, Ghatge MS, Boyiri T. *Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1814(6): 797-809.
4. Sousounis K, Haney CE, Cao J, Sunchu B, Tsonis PA. *Conservation of the three-dimensional structure in non-homologous or unrelated proteins*. Hum Genomics, 2012. 6: 10.
5. Tárraga L, Smilg C. *Tema 9: Transporte de gases. La hemoglobina*. Volviendo a lo básico 2012 [cited; Available from: [http://www.ffis.es/volviendoalobasico/tema\\_9\\_transporte\\_de\\_gases\\_la\\_hemoglobina.html](http://www.ffis.es/volviendoalobasico/tema_9_transporte_de_gases_la_hemoglobina.html)].
6. González F, Ropero P. Capítulo 14: Síndrome talasémico. Madero L, Lassaletta Á, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª ed. Ergon. 2015. Majadahonda (Madrid). p. 151-176.
7. Bunn HF. *Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype*. Blood, 1987. 69(1): 1-6.
8. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. *Comparison of Sebia Capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies*. Am J Clin Pathol, 2008. 130(5): 824-31.
9. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Fucharoen S, Giordano PC, et al. *ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A2*. Int J Lab Hematol, 2012. 34(1): 1-13.
10. Palis J. *Primitive and definitive erythropoiesis in mammals*. Front Physiol, 2014. 5: p. 3.
11. Ribeiro DM, Sonati MF. *Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia*. Genet Mol Res, 2008. 7(4): 1045-53.
12. Kim SI, Bresnick EH, Bultman SJ. *BRG1 directly regulates nucleosome structure and chromatin looping of the alpha globin locus to activate transcription*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(18): 6019-27.
13. Tang Y, Wang Z, Huang Y, Liu DP, Liu G, Shen W, et al. *Gene order in human alpha-globin locus is required for their temporal specific expressions*. Genes Cells, 2006. 11(2): 123-31.
14. Higgs DR. *The molecular basis of alpha-thalassemia*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. 3(1): a011718.
15. Talkington CA, Nishioka Y, Leder P. *In vitro transcription of normal, mutant, and truncated mouse alpha-globin genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(12): 7132-6.
16. Cereghini S, Saragosti S, Yaniv M, Hamer DH. *SV40-alpha-globulin hybrid minichromosomes. Differences in DNase I hypersensitivity of promoter and enhancer sequences*. Eur J Biochem, 1984. 144(3): 545-53.
17. Chen FE, Ooi C, Ha SY, Cheung BM, Todd D, Liang R, et al. *Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients*. N Engl J Med, 2000. 343(8): 544-50.
18. Liehaber SA, Cash FE, Ballas SK. *Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis*. J Biol Chem, 1986. 261(32): 15327-33.
19. Favero ME, Costa FF. *Alpha-hemoglobin-stabilizing protein: an erythroid molecular chaperone*. Biochem Res Int, 2011. 2011: 373859.

## BIBLIOGRAFÍA

20. Mollan TL, Yu X, Weiss MJ, Olson JS. *The role of alpha-hemoglobin stabilizing protein in redox chemistry, denaturation, and hemoglobin assembly*. Antioxid Redox Signal, 2010. 12(2): 219-31.
21. Muñoz JA. *La hemoglobina, nexo de unión entre Hematología y Geografía*. Discurso de ingreso a la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz. 2014
22. Patrinos GP, B. Giardine, C. Riemer, W. Miller, D.H.K. Chui, N.P. Anagnou, H. Wajcman, and R.C. Hardison *Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies*. Nucl. Acids Res . 32 Database issue: D537-541. 2004 [cited; Available from: <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>].
23. Bird GW. *The haemoglobinopathies*. Br Med J, 1972. 1(5796): 363-8.
24. Wajcman H, Blouquit Y, Vasseur C, Le Querrec A, Laniece M, Melevendi C, et al. *Two new human hemoglobin variants caused by unusual mutational events: Hb Zaire contains a five residue repetition within the alpha-chain and Hb Duino has two residues substituted in the beta-chain*. Hum Genet, 1992. 89(6): 676-80.
25. Wajcman H, Dahmane M, Prehu C, Costes B, Prome D, Arous N, et al. *Haemoglobin J-Biskra: a new mildly unstable alpha1 gene variant with a deletion of eight residues (alpha50-57, alpha51-58 or alpha52-59) including the distal histidine*. Br J Haematol, 1998. 100(2): 401-6.
26. Clarke GM, Higgins TN. *Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update*. Clin Chem, 2000. 46(8 Pt 2): 1284-90.
27. American Diabetes Association. *Standards of medical care in diabetes*. Diabetes Care, 2008. 31(S1): 12-54.
28. Little RR, Roberts WL. *A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement*. J Diabetes Sci Technol, 2009. 3(3): 446-51.
29. de la Fuente-Gonzalo F, Ropero P, Martinez-Nieto J, Villegas A, Gonzalez FA, Diaz-Mediavilla J. *[Association between hemoglobin Groene Hart and hemoglobin J-Paris-I: first case in Spain]*. Med Clin (Barc), 2015. 144(5): 212-5.
30. Reynolds TM, McMillan F, Smith A, Hutchinson A, Green B. *Haemoglobin Le Lamentin (alpha 20 (B1) His-->Gln) in a British family: identification by electrospray mass spectrometry*. J Clin Pathol, 1998. 51(6): 467-70.
31. de la Fuente-Gonzalo F, Nieto JM, Vinuesa L, Sevilla J, Diaz-Mediavilla J, Villegas A, et al. *Hb Cibeles [alpha2 CD25(B6) (Gly --> Asp)]: a novel alpha chain variant causing alpha-thalassemia*. Int J Hematol, 2014. 100(6): 599-601.
32. de la Fuente-Gonzalo F, Baiget M, Badell I, Ricard P, Vinuesa L, Martinez-Nieto J, et al. *Study of three families with Hb Agrinio [alpha29(B10)Leu-->Pro, CTG>CCG (alpha2)] in the Spanish population: three homozygous cases*. Hemoglobin, 2012. 36(6): 526-32.
33. Darbellay R, Mach-Pascual S, Rose K, Graf J, Beris P. *Haemoglobin Tunis-Bizerte: a new alpha 1 globin 129 Leu-->Pro unstable variant with thalassaemic phenotype*. Br J Haematol, 1995. 90(1): 71-6.
34. Martin G, Villegas A, Gonzalez FA, Ropero P, Hojas R, Polo M, et al. *A novel mutation of the alpha2-globin causing alpha(+)-thalassemia: Hb Plasencia [alpha125(H8)Leu--Arg (alpha2)]*. Hemoglobin, 2005. 29(2): 113-7.
35. Bento C, Oliveira AC, Neves J, Gameiro M, Cunha E, Coucelo M, et al. *Hb Iberia [alpha104(G11)Cys --> Arg,TGC>CGC (alpha2) (HBA2:c.313T>C)], a new alpha-thalassemic hemoglobin variant found in the Iberian Peninsula: report of six cases*. Hemoglobin, 2012. 36(6): 517-25.
36. Vasseur-Godbillon C, Marden MC, Giordano P, Wajcman H, Baudin-Creuzat V. *Impaired binding of AHSP to alpha chain variants: Hb Groene Hart illustrates a mechanism*

- leading to unstable hemoglobins with alpha thalassemic like syndrome.* Blood Cells Mol Dis, 2006. 37(3): 173-9.
37. Feliu A. *Hemoglobinas inestables.* Hematología, 2009. 13(3): 110-112.
  38. Sanpakit K, Viprakasit V. *Variable genotype-phenotype correlations in patients with a rare nondeletional alpha-thalassemia; Hb Pak Num Po (HBA1: c.396\_397insT).* J Pediatr Hematol Oncol, 2014. 36(3): e185-9.
  39. Charache S, Jenkins T. *Oxygen equilibrium of hemoglobin J Cape Town.* J Clin Invest, 1971. 50(7): 1554-5.
  40. Abdulmalik O, Safo MK, Lerner NB, Ochotorena J, Daikhin E, Lakka V, et al. *Characterization of hemoglobin bassett (alpha94Asp-->Ala), a variant with very low oxygen affinity.* Am J Hematol, 2004. 77(3): 268-76.
  41. do Nascimento TS, Pereira RO, de Mello HL, Costa J. *Methemoglobinemia: from diagnosis to treatment.* Rev Bras Anesthesiol, 2008. 58(6): 651-64.
  42. Rhea JM, Molinaro R. *Pathology consultation on HbA(1c) methods and interferences.* Am J Clin Pathol, 2014. 141(1): 5-16.
  43. Muncie HL, Campbell J. *Alpha and beta thalassemia.* Am Fam Physician, 2009. 80(4): 339-44.
  44. Harteveld CL, Higgs DR. *Alpha-thalassaemia.* Orphanet J Rare Dis, 2010. 5: 13. doi: 10.1186/1750-1172-5-13.
  45. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. *A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster.* Blood, 1989. 73(5): 1081-104.
  46. Fucharoen S, Viprakasit V. *Hb H disease: clinical course and disease modifiers.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: 26-34.
  47. Zhou WJ, Liu WY, Liu D, Jiang JH, Zhou DM, Zhong ZY, et al. *A quantitative assay to detect alpha-thalassemia deletions and triplications using multiplex nested real-time quantitative polymerase chain reaction.* Anal Biochem, 2012. 427(2): 144-50.
  48. Suemasu CN, Kimura EM, Oliveira DM, Bezerra MA, Araujo AS, Costa FF, et al. *Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population.* Braz J Med Biol Res, 2011. 44(1): 16-22.
  49. Higgs DR, Hill AV, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. *Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution.* Nucleic Acids Res, 1984. 12(18): 6965-77.
  50. Embury SH, Miller JA, Dozy AM, Kan YW, Chan V, Todd D. *Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the alpha-thalassemia-2 genotype.* J Clin Invest, 1980. 66(6): 1319-25.
  51. Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL. *Mutation in an intervening sequence splice junction in man.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(8): 5041-5.
  52. Thein SL, Wallace RB, Pressley L, Clegg JB, Weatherall DJ, Higgs DR. *The polyadenylation site mutation in the alpha-globin gene cluster.* Blood, 1988. 71(2): 313-9.
  53. Pirastu M, Saglio G, Chang JC, Cao A, Kan YW. *Initiation codon mutation as a cause of alpha thalassemia.* J Biol Chem, 1984. 259(20): 12315-7.
  54. Olivieri NF, Chang LS, Poon AO, Michelson AM, Orkin SH. *An alpha-globin gene initiation codon mutation in a black family with HbH disease.* Blood, 1987. 70(3): 729-32.
  55. Moi P, Cash FE, Liebhaber SA, Cao A, Pirastu M. *An initiation codon mutation (AUG----GUG) of the human alpha 1-globin gene. Structural characterization and evidence for a mild thalassemic phenotype.* J Clin Invest, 1987. 80(5): 1416-21.

## BIBLIOGRAFÍA

56. Zandian K, Nateghi J, Keikhaie B, Pedram M, Hafezi-Nejad N, Hadavi V, *et al.* *alpha-thalassemia mutations in Khuzestan Province, Southwest Iran*. Hemoglobin, 2008. 32(6): 546-52.
57. Waye JS, Eng B, Patterson M, Chui DH, Nisbet-Brown E, Olivieri NF. *Novel mutation of the alpha 2-globin gene initiation codon (ATG-->A-G) in a Vietnamese girl with Hb H disease*. Hemoglobin, 1997. 21(5): 469-72.
58. Wee YC, Tan KL, Chua KH, George E, Tan JA. *Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System*. Malays J Med Sci, 2009. 16(3): 21-8.
59. Kimura EM, Oliveira DM, Fertrin K, Pinheiro VR, Jorge SE, Costa FF, *et al.* *Hb H disease resulting from the association of an alpha-thalassemia allele [-(alpha)] with an unstable alpha-globin variant [Hb Icaria]: First report on the occurrence in Brazil*. Genet Mol Biol, 2009. 32(4): 712-5.
60. De Jong WW, Meera Khan P, Bernini LF. *Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant*. Am J Hum Genet, 1975. 27(1): 81-90.
61. Merritt D, Jones RT, Head C, Thibodeau SN, Fairbanks VF, Steinberg MH, *et al.* *Hb Seal Rock [(alpha 2)142 term-->Glu, codon 142 TAA-->GAA]: an extended alpha chain variant associated with anemia, microcytosis, and alpha-thalassemia-2 (-3.7 Kb)*. Hemoglobin, 1997. 21(4): 331-44.
62. Waye JS, Eng B, Patterson M, Chui DH, Olivieri NF. *Identification of a novel termination codon mutation (TAA-->TAT, Term-->Tyr) in the alpha 2 globin gene of a Laotian girl with hemoglobin H disease*. Blood, 1994. 83(11): 3418-20.
63. Steinberg MH, Adams JG. *Thalassemic hemoglobinopathies*. Am J Pathol, 1983. 113(3): 396-409.
64. Badens C, Rose C. *Alfa-talasemia - síndrome mielodisplásico (ATMDS)*. Revisores expertos ORPHA 231401 2013 [cited; Available from: [http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=ES&Expert=231401](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=231401)].
65. Gibbons R. *Alfa talasemia - deficiencia intelectual ligada al X (Síndrome ATR-X)*. Revisores expertos ORPHA 847 2006 [cited; Available from: [http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=847](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=847)].
66. Badens C. *Síndrome de alfa talasemia - deficiencia intelectual ligada al cromosoma 16 (Síndrome ATR-16)*. Revisores expertos ORPHA 98791 2013 [cited; Available from: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=98791&lng=ES](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=98791&lng=ES)].
67. Briceno Polacre OM, Gonzalez Fernandez FA, Ropero Gradilla P, Ruiz A, Gonzalez M, Briceno J, *et al.* *[No deletion alpha thalassaemia in Spain. Abnormal hematological index and molecular study]*. Invest Clin, 2011. 52(2): 111-20.
68. López-Escribano H, Vila Vidal M, Barceló Bennassar A, Riesco Prieto M, Ayllón Gatnau O. *Neonatal screening of sickle cell disease in the Balearic Islands Autonomous Community. Pilot study in anonymous unrelated population*. An Pediatr (Barc), 2009. 70(5): 429-433.
69. Mañú Pereira M, Corrons J. *Neonatal haemoglobinopathy screening in Spain*. J Clin Pathol, 2009. 62(1): 22-25.
70. Instituto Nacional de Estadística (INE) [cited; Available from: <http://www.ine.es/>].
71. Ministerio de Empleo y Seguridad Social [cited; Available from: <http://www.empleo.gob.es/index.htm>].
72. Azma RZ, Ainoon O, Hafiza A, Azlin I, Noor Farisah AR, Nor Hidayati S, *et al.* *Molecular characteristic of alpha thalassaemia among patients diagnosed in UKM Medical Centre*. Malays J Pathol, 2014. 36(1): 27-32.

73. Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervasio SA, Costa FF, Sonati MF. *High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia*. Braz J Med Biol Res, 2001. 34(6): 759-62.
74. Scheps KG, Francipane L, Nash A, Cerrone GE, Copelli SB, Varela V. *[Molecular bases of alpha-thalassemia in Argentina]*. Medicina (B Aires), 2015. 75(2): 81-6.
75. Farra C, Badra R, Fares F, Muwakkit S, Dbaibo G, Dabbous I, et al. *Alpha thalassemia allelic frequency in Lebanon*. Pediatr Blood Cancer, 2015. 62(1): 120-2.
76. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermisri T. *Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis*. Eur J Haematol, 2008. 80(6): 510-4.
77. Traeger-Synodinos J, Douna V, Papassotiriou I, Stamoulakatou A, Ladis V, Siahianidou T, et al. *Variable and often severe phenotypic expression in patients with the alpha-thalassemic variant Hb Agrinio [alpha29(B10)Leu-->Pro (alpha2)]*. Hemoglobin, 2010. 34(5): 430-8.
78. Wajcman H, Vasseur C, Pissard S, Baudin-Creuzat V. *alpha-Hemoglobin stabilizing protein: a modulating factor in thalassemias?* Hemoglobin, 2011. 35(5-6): 463-8.
79. Cunha E, Bento C, Oliveira A, Relvas L, Neves J, Gameiro M, et al. *Hb Plasencia [alpha125(H8)Leu-->Arg (alpha2)] is a frequent cause of alpha+-thalassemia in the Portuguese population*. Hemoglobin, 2013. 37(2): 183-7.
80. de la Fuente-Gonzalo F, Nieto JM, Ricard P, Anguita J, Martinez R, Cervera A, et al. *Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb La Mancha and Hb Goya: Description of 4 new haemoglobinopathies*. Clin Biochem, 2015. 48(10-11): 662-7.
81. de la Fuente-Gonzalo F, Nieto JM, Velasco D, Cela E, Pérez G, Fernández-Teijeiro A, et al. *Hb Puerta del Sol [HBA1:c.148A>C], Hb Valdecilla [HBA2:c.3G>T], Hb Gran Vía [HBA2:c.98T>G], Hb Macarena [HBA2:c.358C>T], and Hb El Retiro [HBA2:c.364\_366dupGTG]: Description of 5 new hemoglobinopathies*. Clin Chem Lab Med, 2015. (en prensa).
82. Groff P, Galacteros F, Kalmes G, Blouquit Y, Wajcman H. *Hb Luxembourg [alpha 24(B5) Tyr----His]: a new unstable variant*. Hemoglobin, 1989. 13(5): 429-36.
83. Zeng YT, Huang SZ, Zhou XD, Qiu XK, Dong QY, Li MY, et al. *Hb Shenyang (alpha 26 (B7) Ala replaced by Glu): a new unstable variant found in China*. Hemoglobin, 1982. 6(6): 625-8.
84. Harteveld CL, Vervloet M, Zweegman S, van Delft P, Akkermans N, Arkestijn S, et al. *Hb Amsterdam [alpha32(B13)Met--Ile (alpha2)]: a new unstable variant associated with an alpha-thalassemia phenotype and a new African polymorphism*. Hemoglobin, 2005. 29(4): 257-62.
85. Phylipsen M, Prior JF, Lim E, Lingam N, Finlayson J, Arkestijn SG, et al. *Two new alpha1-globin gene point mutations: Hb Nedlands (HBA1:c.86C>T) [alpha28(B9)Ala-->Val] and Hb Queens Park (HBA1:c.98T>A) [alpha32(B13)Met-->Lys]*. Hemoglobin, 2010. 34(2): 123-6.
86. Ayala S, Colomer D, Gelpi JL, Corrons JL. *alpha-Thalassaemia due to a single codon deletion in the alpha1-globin gene. Computational structural analysis of the new alpha-chain variant. Mutations in brief no. 132. Online*. Hum Mutat, 1998. 11(5): 412.
87. Sellaye M, Blouquit Y, Galacteros F, Arous N, Monplaisir N, Rhoda MD, et al. *A new silent hemoglobin variant in a black family from French West Indies, hemoglobin Le Lamentin alpha 20 His replaced by Gln*. FEBS Lett, 1982. 145(1): 128-30.
88. Wiener K, McFarlane X, Green BN. *Increasing recognition of haemoglobin Le Lamentin*. J Clin Pathol, 2001. 54(12): 970.
89. de la Fuente-Gonzalo F, Sala F, Roperio P, Gonzalez FA. *[First world case of -alpha3,7-associated Hb J-Camaguey]*. Med Clin (Barc), 2012. 138(9): 412-3.

## BIBLIOGRAFÍA

90. Masala B, Musino L, Pirastru M, Manca L. *The C-->G transition in the alpha 2-globin gene of a normal alpha alpha-chromosome is responsible for the Hb G-Philadelphia variant in Sardinians*. Eur J Haematol, 2004. 72(6): 437-40.
91. Molchanova TP, Pobedinskaya DD, Ye Z, Huisman TH. *Two different mutations in codon 68 are observed in Hb G-Philadelphia heterozygotes*. Am J Hematol, 1994. 45(4): 345-6.
92. Shimasaki S. *A new hemoglobin variant, hemoglobin Nunobiki [alpha 141 (HC3) Arg----Cys]. Notable influence of the carboxy-terminal cysteine upon various physico-chemical characteristics of hemoglobin*. J Clin Invest, 1985. 75(2): 695-701.
93. Kazanetz EG, Leonova JY, Huisman TH, van der Dijns FP, Smit JW. *Hb Nunobiki or alpha 2 141 (HC3)Arg-->Cys beta 2 in a Belgian female results from a CGT-->TGT mutation in the alpha 2-globin gene*. Hemoglobin, 1996. 20(4): 443-5.
94. Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la Fuente-Gonzalo, F, Martínez J, et al. *Hb Nunobiki [ $\alpha$ 2 141 (HC3) Arg>Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or acquired?* J Genet Syndr Gene Ther, 2013. 4: 180.
95. de la Fuente-Gonzalo F, Martinez Nieto J, Torrejon MJ, Mayor LA, Velasco D, Gonzalez Fernandez FA, et al. *[Hb Burgos (alpha1 CD64(E13)(Asp-->Asn)): a new hemoglobin variant detected during follow-up of diabetic patients]*. Med Clin (Barc), 2014. 144(1): 26-9.
96. Villegas A, Porres A, Sanchez J, Gonzalez FA, Perez-Clausell C, Martinez M, et al. *Red blood cell phenotypes in alpha-thalassemias in the Spanish population*. Haematologica, 1998. 83(2): 99-103.
97. Tritipsombut J, Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, Siriratmanawong N, Pinmuang-ngam C, et al. *Hemoglobin profiles and hematologic features of thalassemic newborns: application to screening of alpha-thalassemia 1 and hemoglobin E*. Arch Pathol Lab Med, 2008. 132(11): 1739-45.
98. Venugopal S, Dhuri S, Al Jabal KB, Shaju A. *Hemoglobin H disease in Muscat, Oman - A 5 year study*. Oman Med J, 2008. 23(2): 82-5.
99. Pulsinelli PD, Perutz MF, Nagel RL. *Structure of hemoglobin M Boston, a variant with a five-coordinated ferric heme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(12): 3870-4.
100. Luo HY, Irving I, Prior J, Lim E, Eung SH, Skelton TP, et al. *Hemoglobin Titusville, a low oxygen affinity variant hemoglobin, in a family of Northern European background*. Am J Hematol, 2004. 77(4): 384-6.
101. Pedro Miramontes. *Un modelo de autómatas celular para la evolución de los ácidos nucleicos*, in *Matemáticas*. 1992, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): México DF.

## **X. ANEXOS**





El trabajo realizado para llevar a cabo la presente tesis ha dado lugar a diversas publicaciones y múltiples comunicaciones en congresos tanto nacionales como internacionales. A continuación se reseña un breve resumen:

## **X.1 COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADOS CON LA PRESENTE TESIS**

- 15<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Barcelona 10-13 Junio 2010. European Hematology Association.
  - Exposición tipo poster: A. Villegas, **F. De la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, FA. González, S. Redondo. Compilation of alpha-chain hemoglobinopathies that occur with microcytosis. *Haematologica* 2010; 95(s2): 433.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: A. Villegas, L. Vinuesa, **F. De la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, S. Redondo, P. Roper, FA. González. First case of Hb J-Camagüey associated with alpha 3.7 in Spanish population. *Haematologica* 2010; 95(s2): 720.
- LII Reunión Nacional SEHH, XXVI Congreso Nacional SETH: Las Palmas de Gran Canaria 28-30 Octubre 2010. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.
  - Exposición oral: **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, F.A. González, S. Redondo, E. Bolaños, F. Medina, A. Villegas y Grupo Español de Eritropatología. Biología molecular de algunas hemoglobinas hiperinestables encontradas en la población española. *Haematologica* Vol. 95.2, Octubre 2010.

- Exposición oral: **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, F.A. González, S. Redondo, E. Bolaños, F. Medina, A. Villegas y Grupo Español de Eritropatología. Recopilación de hemoglobinopatías de cadena  $\alpha$  que cursan con microcitosis. Haematologica Vol. 95.2, Octubre 2010.
- Exposición tipo poster: L. Vinuesa, **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, P. Roper, F.A. González, B. Pérez, E. Fontanés, C.Seri, F. Sala, A. Villegas y Grupo Español de Eritropatología. Primer caso de Hb J-Camagüey asociado con  $-\alpha^{3.7}$  en la población mundial. Haematologica Vol. 95.2, Octubre 2010.
- Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, F.A. González, B. Pérez, E. Bolaños, F. Medina, A. Villegas y Grupo Español de Eritropatología. La interacción entre las herramientas de diagnóstico molecular en las talasemias: un caso práctico. Haematologica Vol. 95.2, Octubre 2010.
- 16<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Londres 9-12 Junio 2011. European Hematology Association.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: P. Roper, **F. De la Fuente-Gonzalo**, M. Baiget, I. Badell, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, A. Villegas, P. Ricard, J. Díaz-Mediavilla. Study of three families with hemoglobin Agrinio in Spanish population: Three homozygotes cases. Haematologica 2011; 96(s2).

- LIII Reunión Nacional SEHH, XXVII Congreso Nacional SETH: Zaragoza 27-29 Octubre 2011. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.
  - Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, M. Baiget, I. Badell, P. Ricard, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, H. Monfredini, P. Roper, A. Villegas, F.A. González, E. Anguita, J. Díaz-Mediavilla. Estudio de tres familias con hemoglobina Agrinio en población española: tres casos homocigotos. Haematologica Vol. 96.2, Octubre 2011.
  - Exposición tipo poster: SF. Medina, F. Bolaños, B. Arrizabalaga, V. Recasens, E. Contreras, L. Costilla, P. Roper, **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, A. Villegas, F.A. González, J. Díaz-Mediavilla. Caracterización de tres hemoglobinopatías que cursan con cianosis y/o descenso de la saturación de O<sub>2</sub>. Haematologica Vol. 96.2, Octubre 2011.
  - Exposición tipo poster: I. delgado, E. Cela, R. Guillen, **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, J. Villarubia, A. Villegas, F.A. González, J. Díaz-Mediavilla. Hemoglobinopatía S homocigoto y heterocigoto asociada a hemoglobinopatía G-Philadelphia. Haematologica Vol. 96.2, Octubre 2011.
  - Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Sevilla, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, F.A. González, E. Anguita, G. Mikyo Yumi, JA Vázquez, J. Díaz-Mediavilla. Primeros casos de una mutación

puntual en 3'UTR del gen de la alfa-globina. Haematologica Vol. 96.2, Octubre 2011.

- Publicación en el libro de *abstracts*: **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Galarón, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, P. Roper, A. Villegas, E. Fontanes, B. Pérez, C. Seri, F.A. González, J. Díaz-Mediavilla. Primeros casos en España de Hb Q-Thailand asociada a alfa-talasemia deleción ( $\alpha^{4.2}$ ). Haematologica Vol. 96.2, Octubre 2011.
- VII Jornadas Complutenses, VI Congreso Nacional de Investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y XI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas: Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid 13-14 Abril 2012.
  - Exposición tipo poster: **Félix de la Fuente Gonzalo**, Paloma Roper Gradilla, Rafaela Raposo González. Importancia del diagnóstico de alfa-talasemias no deleción.
- 17<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Amsterdam 14-17 Junio 2012. European Hematology Association.
  - Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, P. Roper, E. Fontanes, C. Seri, E. Bolaños, F.A. González, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Importance of diagnosis of non-deletional alpha thalassemia. Haematologica 2012 Vol 97, e-suplement 1, June 14-17, 2012, 199-200.
  - Exposición tipo poster: J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Roper, F.A. González, E. Anguita, B Pérez, E. Fontanes,

- A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Improvement of genetic diagnosis in  $\alpha$ -thalassemia patients: MLPA detection of eleven alterations in the  $\alpha$  globin cluster (including three novel deletions). *Haematologica* 2012 Vol. 97, e-suplement 1, June 14-17, 2012, 463.
- Publicación en el libro de *abstracts*: **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Ropero, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, B. Pérez, C. Seri, F. Medina, F.A. González, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Characterization of 3 hemoglobinopathies that present cyanosis and descent of the saturation of O<sub>2</sub>. *Haematologica* 2012 Vol. 97, e-suplement 1, June 14-17, 2012, 800.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: P. Ropero, **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, E. Fontanes, C. Seri, E Bolaños, F.A. González, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Homozygous and heterozygous hemoglobin S associated with hemoglobin G-Philadelphia. *Haematologica* 2012 Vol. 97, e-suplement 1, June 14-17, 2012, 800.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Ropero, F.A. González, B. Pérez, E. Fontanes, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Alpha globin gene copy number variations leading to a full  $\beta$ -thalassemia phenotype spectrum: a retrospective study. *Haematologica* 2012 Vol. 97, e-suplement 1, June 14-17, 2012, 798-800.

- LIV Reunión Nacional SEHH, XXVIII Congreso Nacional SETH: Salamanca 18-20 Octubre 2012. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.
  - Exposición oral: J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Roperio, F.A. González, E Bolaños, F. Medina, E. Anguita, A. Manubens, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Diagnóstico genético en casos de  $\alpha$ -talasemia: Hallazgo de 12 deleciones raras en el cluster  $\alpha$  de globinas por Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification.
  - Exposición oral: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, P. Roperio, F.A. González, E Bolaños, F. Medina, E. Coria, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla y Grupo Español de Eritropatología. Importancia del diagnóstico de alfa-talasemias no deleción.
- Euromedlab 2013. Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica.
  - Exposición tipo poster: M. Torrejón, P. Roperio, MT. Sanz-Casla, **F. de la Fuente-Gonzalo**, FA. Gonzalez, J. Díaz-Mediavilla, M. Arroyo. A new hemoglobin variant detected in the monitoring of diabetes through HBA1c. Biochimica clinica 2013 Vol. 37, SS S637
- 18<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Stockholm 13-16 Junio 2013. European Hematology Association.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, P. Roperio, F.A. González, A. Villegas, SF. Medina, E. Bolaños, H. Monfredini, JA. Vázquez, GM. Yumi, J. Díaz-

Mediavilla. The high frequency of Hb Groene Hart in Spain; First case of association of this variant with Hb J-Paris-I.

- Publicación en el libro de *abstracts*: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, P. Roper, J. Sevilla, F.A. González, A. Villegas, SF. Medina, E. Bolaños, M. Gutiérrez, A. Manubens, E. Coria, J. Díaz-Mediavilla. Hb Cibeles [ $\alpha 2$  CD25(B6) Gly>Asp]: A novel alpha chain variant causing alpha-thalassemia.
- LV Reunión Nacional SEHH, XXIX Congreso Nacional SETH: Sevilla 17-19 Octubre 2013. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.
  - Exposición tipo poster comentado: **F. de la Fuente-Gonzalo**, P. Roper, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, F.A. González, A. Villegas, GM. Yumi, JA. Vázquez, H. Monfredini, E. Coria, J. Díaz-Mediavilla y Grupo Español de Eritropatología. La alta frecuencia de Hb Groene Hart en España: Primer caso de asociación de esta variante con Hb J-París-I.
  - Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, MJ. Torrejón, P. Roper, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, F.A. González, A. Villegas, M. Gutiérrez, A. Manubens, E. Coria, W. Torres, DS. Toral, J. Díaz-Mediavilla, D. Velasco-Rodríguez, JM. Alonso-Domínguez, J. Villarrubia. Una nueva variante de hemoglobina detectada durante la monitorización de la diabetes.
  - Exposición tipo poster: P. Roper, ML. González, **F. de la Fuente-Gonzalo**, L. Vinuesa, J. Martínez-Nieto, F.A. González, JA. Vázquez, H.



Monfredini, GM. Yumi, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla. Hb Nunobiki [α2141(HC3)Arg>Cys; HBA2:c.424C>T] mutación de novo o adquirida?

- Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Sevilla, P. Roper, J. Martínez-Nieto, L. Vinuesa, F.A. González, A. Villegas, GM. Yumi, JA. Vázquez, H. Monfredini, A. Manubens, E. Coria, J. Díaz-Mediavilla. Hb Cibeles [α2 CD25(B6)Gly>Asp]): Una nueva variante de cadena alfa causante de alfa-talasemia.
- 19<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Milan 12-15 Junio 2014. European Hematology Association.
  - Exposición tipo poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, F.A. González, L. Vinuesa, P. Ricard, C. Garrido, R. Martínez, A. Cervera, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla, P. Roper. Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb La Mancha and Hb Goya: description of four new hemoglobinopathies.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: **F. de la Fuente-Gonzalo**, MJ. Torrejón, D. Velasco, LA. Mayor, J. Martínez-Nieto, F.A. González, A. Villegas, J. Díaz-Mediavilla, P. Roper. Hb Burgos [α1 CD64(E13) Asp>Asn]): A new hemoglobin variant.
- LVI Reunión Nacional SEHH, XXX Congreso Nacional SETH: Madrid 6-8 Noviembre 2014. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.

- Exposición Oral: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, F.A. González, L. Vinuesa, P. Ricard, C. Garrido, R. Martínez, A. Cervera, A. Villegas, P. Roper. Hb Cervantes [ $\alpha 2$  CD118(H1)(Thr>Ile)], Hb Marañón [ $\alpha 2$  CD31(B12)(Arg>Gly)], Hb La Mancha [ $\alpha 2$  CD91(FG3)(Leu>Arg)] y Hb Goya [ $\alpha 2$  CD52(E1)-CD59(E8) (-24pb)]: descripción de cuatro nuevas hemoglobinopatías.
- Exposición Oral: ML. González Borrachero, **F. de la Fuente-Gonzalo**, F.A. González, J. Martínez-Nieto, A. Villegas, P. Roper. Una nueva delta-o-talasemia asociada a Hb Watts origina una disminución de los niveles de HbA2.
- 20<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association: Viena 11-14 Junio 2015. European Hematology Association.
  - Exposición tipo e-poster: **F. de la Fuente-Gonzalo**, J. Martínez-Nieto, D. Velasco, E. Cela, E. Del Campo, A. Fernández-Teijeiro, A. Escudero Soto, R.B. Martínez Martínez, A. Villegas, F.A. González, P. Roper. Hb Puerta del Sol, Hb Valdecilla, Hb Gran Vía, Hb Macarena and Hb El Retiro: description of five new hemoglobinopathies.
  - Exposición tipo e-poster: W. Torres, M. García Roa, M. Gutiérrez Alvariño, E. Coria, L. Sánchez Noboa, D.S. Toral Ibarra, P. Roper Gradilla, **F. de la Fuente-Gonzalo**, J.M. Nieto, A. Villegas, R.B. Martínez Martínez, F.A. González. Characterization of 6 hemoglobinopathies occurring with cyanosis and/or lowering the oxygen saturation.

- LVII Reunión Nacional SEHH, XXXI Congreso Nacional SETH: Valencia 22-24 Octubre 2015. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.
  - Exposición Oral: P. Ropero Gradilla, **F. De la Fuente-Gonzalo**, JM. Nieto, FA. González, A. Villegas, R. Martínez. Valor diagnóstico de la Hb A<sub>2</sub> disminuida.
  - Exposición tipo poster comentado: **F. De La Fuente Gonzalo**, JM. Nieto, D. Velasco, E. Cela, G. Pérez, A. Fernández-Teijeiro, A. Escudero, R. Martínez, A. Villegas, FA. González Fernández, P. Ropero, Grupo Español de Eritropatología. Hb Puerta del Sol, Hb Valdecilla, Hb Gran Vía, Hb Macarena y Hb El Retiro: Descripción de 5 nuevas hemoglobinopatías.
  - Publicación en el libro de *abstracts*: P. Ropero Gradilla, R. Martínez, **F. De la Fuente-Gonzalo**, JM. Nieto, FA. González, A. Villegas, R. Martínez. Diferentes formas de Hb Le Lamentin. Hallazgos inesperados en la cuantificación de Hb A1c.

## X.2 PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS

1. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Francisco Sala, Paloma Ropero, Fernando Ataúlfo González. Primer caso de Hb J-Camagüey asociado a  $-\alpha^{3.7}$  en la población mundial. Med Clin (Barc). 2012 Apr 14; 138(9):412-3. Factor de impacto: 1,252
2. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Montserrat Baiget, Isabel Badell, Pilar Ricard, Lara Vinuesa, Jorge Martínez-Nieto, Paloma Ropero, Ana Villegas, Fernando Ataúlfo González, Joaquín Díaz-Mediavilla y Grupo Español de Eritropatología. Study of three families with Hb Agrinio [ $\alpha 29(\text{B}10)\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}$ , CTG>CCG ( $\alpha 2$ )] in the Spanish population: three homozygous cases. Hemoglobin. 2012; 36(6):526-32. Factor de impacto: 0,955
3. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Paloma Ropero, Jorge Martínez-Nieto, Ana Villegas, Fernando Ataúlfo González, Joaquín Díaz-Mediavilla. Association between hemoglobin Groene Hart and hemoglobin J-Paris-I: First case in Spain. Med Clin (Barc). 2015 Mar 9; 144(5):212-5. Factor de impacto: 1,252
4. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Jorge M. Nieto, Lara Vinuesa, Julián Sevilla, Joaquín Díaz-Mediavilla, Ana Villegas, Fernando Ataúlfo González, Paloma Ropero. Hb Cibeles [ $\alpha 2 \text{ CD}25(\text{B}6) (\text{Gly} \rightarrow \text{Asp})$ ]: a novel alpha chain variant causing alpha-thalassemia. Int J Hematol. 2014 Dec; 100(6):599-601. Factor de impacto: 1,679
5. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Jorge M. Nieto, María José Torrejón, Luis A. Mayor, Diego Velasco, Fernando Ataúlfo González, Paloma Ropero. Hb Burgos ( $\alpha 1 \text{ CD}64(\text{E}13)(\text{Asp} \rightarrow \text{Asn})$ ): A new hemoglobin variant detected during follow-up of diabetic patients. Med Clin (Barc). 2015 Jan 6; 144(1):26-9. Factor de impacto: 1,252
6. Paloma Ropero, María Luisa González-Borrachero, Aurora Peña, Fernando Ataúlfo González, **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Jorge Martínez, Lara Vinuesa, Ana Villegas, Joaquín Díaz-Mediavilla. Hb Nunobiki [ $\alpha 2 \text{ 141 (HC3) Arg} \rightarrow \text{Cys}$ ;

HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or acquired? J Genet Syndr Gene Ther 4:180. Doi:10.4172/2157-7412.1000180

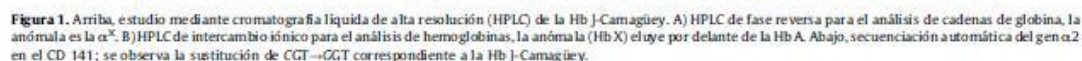
7. María Luisa González Borrachero, **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Fernando Ataúlfo González, Jorge Martínez Nieto, Ana Villegas, Paloma Ropero. Delta<sup>0</sup>-thalassemia by insertion of 27 base pairs in  $\delta$ -globin gene with decreased hemoglobin A<sub>2</sub> levels. Med Clin (Barc). 2015 Apr 8; 144(7):312-6. Factor de impacto: 1,252

8. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Jorge M. Nieto, Pilar Ricard, Javier Anguita, Rosalina Martínez, Aurea Cervera, Ana Villegas, Fernando Ataúlfo González, Paloma Ropero. Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb La Mancha and Hb Goya: Description of 4 new haemoglobinopathies. Clin Biochem. 2015; 48:662-7. Factor de impacto: 2,23

9. **Félix de la Fuente-Gonzalo**, Jorge M. Nieto, Diego Velasco, Elena Cela, Germán Pérez, Ana Fernández-Teijeiro, Antonio Escudero, Ana Villegas, Fernando A. González-Fernández, Paloma Ropero. Hb Puerta del Sol [HBA1:c.148A>C], Hb Valdecilla [HBA2:c.3G>T], Hb Gran Vía [HBA2:c.98T>G], Hb Macarena [HBA2:c.358C>T], and Hb El Retiro [HBA2:c.364\_366dupGTG]: Description of 5 new hemoglobinopathies. Clin Chem Lab Med, 2015. (en prensa). Factor de impacto: 2,707

doi: 10.1016/j.imedcli.2011.07.002

El objetivo de este trabajo es la descripción del primer caso en el mundo de Hb J-Camagüey [ $\alpha 141(\text{HC3})\text{Arg} \rightarrow \text{Gly}$ ] asociado en trans con una alfa talasemia ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ).



La *propositus* es una mujer de 70 años de edad, natural de Navarra, en la que durante un examen rutinario se detectó un pico anómalo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Variant™.

Los datos hematimétricos muestran unos recuentos normales: hematies  $5,5 \times 10^{12}/l$ ; hemoglobina 13,7 g/dl; Hto 41,5%; VCM 75,3 fl; HCM 24,9 pg y Retis 1,3%. Morfología de serie roja normal con ligera microcitosis e hipocromía, leucocitos  $5,6 \times 10^9/l$ , con fórmula normal, plaquetas  $264 \times 10^9/l$ . Hb A<sub>2</sub> 1,9%, Hb F 1,2%, sideremia e IST normales. La variante de hemoglobina se separó por HPLC Variant™ y las cadenas de globina mediante HPLC de fase reversa (fig. 1).

Dada la existencia de microcitosis e hipocromía con cifras normales de Hb A<sub>2</sub> y ausencia de ferropenia, se realizó el estudio molecular de alfa talasemia. El ADN genómico procedente de los leucocitos de sangre periférica fue extraído de manera automática (Bio-Robot EZ1, Quiagen) y el cribado de las mutaciones más frecuentes de alfa talasemia mediante  $\alpha$ -globin StripAssay (ViennaLab Diagnostic GmbH, Austria), poniendo de manifiesto la existencia de una alfa talasemia por pérdida de un gen  $\alpha$  ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ). La secuenciación automática del ADN genómico específica para los genes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  demostró una mutación puntual CGT→GGT en el codón 141 del gen  $\alpha_2$  (Hb J-Camagüey) (fig. 1).

La Hb J-Camagüey es el resultado del cambio de arginina por lisina en el aminoácido 141 de la cadena  $\alpha$ ; el primer caso fue publicado en el año 1978 en una familia cubana de origen español<sup>2</sup>. Posteriormente se ha descrito en otras 3 familias de origen español<sup>3</sup> y en 2 familias en China y Australia, en una de ellas asociada a una alfa<sup>0</sup> talasemia<sup>4,5</sup>.

Al menos existen otras 5 hemoglobinopatías estructurales que afectan al aminoácido 141 de la cadena  $\alpha$  y en todas ellas la hemoglobina resultante se separa fácilmente de la Hb A mediante electroforesis convencional en acetato de celulosa a pH alcalino o mediante HPLC<sup>6</sup>, debido a que el aminoácido 141 se encuentra en el extremo C-terminal de la cadena  $\alpha$ .

La asociación de alfa talasemia con hemoglobinopatías estructurales es relativamente normal, siendo las hemoglobinopatías de cadena  $\alpha$  las más comunes en tales asociaciones y la más frecuente es la Hb G-Philadelphia [ $\alpha 68(E17)Asn \rightarrow Lys$ ], aunque también se han visto asociadas a hemoglobinopatías de cadena  $\beta$ .

Se han descrito homocigotos y heterocigotos de Hb S asociados a alfa talasemia<sup>7,8</sup>. La asociación de Hb S heterocigoto y una alfa talasemia produce una disminución de Hb S proporcional al número de genes  $\alpha$  delecionados.

En nuestro caso, la Hb J-Camagüey se asocia en trans a la pérdida de un gen  $\alpha$  ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ). Es el primer caso en la literatura médica en que encontramos la asociación de ambas patologías.

Hasta la actualidad, la ubicación exacta de la mutación dentro de los genes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  no estaba determinada. La amplificación específica del gen  $\alpha_2$  con su secuencia 3' UTR demuestra que la Hb J-Camagüey se encuentra localizada en dicho gen.

La asociación de la deleción  $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$  con la formación de un gen de fusión  $\alpha_2/\alpha_1$  en el otro alelo posibilita la interpretación de la secuenciación automática, dado que al no poder amplificarse el alelo con la mutación  $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ , la única secuencia observada es la Hb J-Camagüey, lo que en un primer término simula una variante de hemoglobina en estado homocigoto.

## Bibliografía

1. Villegas A, Ropero P, González FA, Anguita E, Espinós D. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin*. 2001;25:273-83.
2. Martínez G, Lima F, Residenti C, Colombo B. Hb J Camagüey and alpha 2 141 (HC3) Arg replaced by Gly beta 2: a new abnormal human hemoglobin. *Hemoglobin*. 1978;2:47-52.
3. Romero MJ, Garrido ML, Abril E, Garrido F, de Pablos JM. Detection of Hb J-Camagüey [alpha 141(HC3)Arg→Gly] in three Spanish families. *Hemoglobin*. 1995;19:287-9.
4. Xiong F, Yang KG, Lian CC, Huang YW, Wang RX, Zhang NJ. A case of Hb J-Camagüey or alpha 2141(HC3)Arg→Gly beta 2 in a Chinese family. *Hemoglobin*. 1984;8:397-9.
5. Brennan SO, Lowrey IR, Harris MG, Rodwell R, Zarkos K, Wilkinson T, et al. Hb J-Camagüey [alpha 141(HC3)Arg→Gly] associated with alpha-thalassaemia-1 in an Australian family. *Hemoglobin*. 1991;15:303-7.
6. Moo-Penn WF, Hine TK, Johnson MH, Jue DL, Holland S, George S, et al. Hb Rancho Mirage [beta 143(H21)His→Asp]: a variant in the 2,3-DPG binding site showing normal oxygen affinity at physiological pH. *Hemoglobin*. 1992;16:35-44.
7. Ataúlfo González F, Blázquez C, Ropero P, Briceño O, Alaez C, Polo M, et al. Asociación de hemoglobinopatía S y alfa talasemia. Análisis de 45 casos. *Med Clin (Barc)*. 2005;124:726-9.
8. Ropero P, González FA, Hernández A, Sánchez H, Cela E, Villegas A. Diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y talasemias. *Med Clin (Barc)*. 2009;132:53-6.

Félix de la Fuente-González<sup>a</sup>, Francisco Sala<sup>b</sup>, Paloma Ropero<sup>a,\*</sup> y Fernando Ataúlfo González<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

<sup>b</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital de Navarra, Pamplona, España

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: propero.hcsc@salud.madrid.org (P. Ropero).

doi: 10.1016/j.medcli.2011.06.015



## X.2.2 STUDY OF THREE FAMILIES WITH Hb AGRINIO [ $\alpha 29(\text{B10})\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}$ , CTG>CCG ( $\alpha 2$ )] IN THE SPANISH POPULATION: THREE HOMOZYGOUS CASES

*Hemoglobin*, 2012; 36(6): 526–532  
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.  
ISSN: 0363-0269 print/1532-432X online  
DOI: 10.3109/03630269.2012.733988

**informa**  
healthcare

### ORIGINAL ARTICLE

#### STUDY OF THREE FAMILIES WITH Hb AGRINIO [ $\alpha 29(\text{B10})\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}$ , CTG>CCG ( $\alpha 2$ )] IN THE SPANISH POPULATION: THREE HOMOZYGOUS CASES

Felix de la Fuente-Gonzalo,<sup>1</sup> Montserrat Baiget,<sup>2</sup> Isabel Badell,<sup>2</sup> Pilar Ricard,<sup>3</sup>  
Lara Vinuesa,<sup>1</sup> Jorge Martinez-Nieto,<sup>1</sup> Paloma Ropero,<sup>1</sup> Ana Villegas,<sup>1</sup>  
Fernando A. González,<sup>1</sup> Joaquín Díaz-Mediavilla<sup>1</sup> and The Erythropathology  
Spanish Group

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital Fundación de Alcorcón de Madrid, Madrid, Spain

□ Most  $\alpha$ -thalassemia ( $\alpha$ -thal) mechanisms are deletions of one or both  $\alpha$ -globin genes and less than 5.0–10.0% are point mutations. Hb Agrinio [ $\alpha 29(\text{B10})\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}$ , CTG>CCG ( $\alpha 2$ )] is a hyperunstable  $\alpha$  chain structural variant in which the thalassemic phenotype is determined by a post translational precipitation of the structurally anomalous chain in erythroid precursors. This study involved 14 cases with Hb Agrinio from three families.

Selective sequencing of the  $\alpha 2$  gene showed a CTG(Leu)>CCG(Pro) mutation at codon 29. The mutation was found in a heterozygous state in 11 cases and in a homozygous state in three cases. These are the first cases with Hb Agrinio described in Spain. In all cases where a leucine is exchanged for a proline, an unstable hemoglobin (Hb) will occur both in the  $\alpha$  and the  $\beta$  chain. Some of these are as unstable as Hb Agrinio and their presence is difficult to detect except by DNA sequencing.

**Keywords** Nondeletional  $\alpha$ -thalassemia ( $\alpha$ -thal), Hyperunstable hemoglobinopathy, Homozygotes, Spanish

### INTRODUCTION

One of the most frequent monogenetic disorders is  $\alpha$ -thalassemia ( $\alpha$ -thal), characterized by a deficiency ( $\alpha^+$ ) or absence ( $\alpha^0$ ) of hemoglobin (Hb)  $\alpha$  chain

Received 27 March 2012; Accepted 5 July 2012

Address correspondence to Dr. Paloma Ropero, Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Profesor Martín Lagos s/n, Madrid, Spain; Tel: +34-91-330-3321; Fax: +34-91-330-3322; E-mail: propero.hcsc@salud.madrid.org



synthesis. Unlike  $\alpha$ -thalassemias, most  $\alpha$ -thal molecular mechanisms are deletions of one or both  $\alpha$ -globin genes and less than 5.0-10.0% are point mutations that may affect RNA transcription, post transcriptional processing or instability, and these latter cases are called nondeletional  $\alpha$ -thal. The phenotypical expression of  $\alpha$ -thal varies considerably and depends on the number of  $\alpha$  genes with functional loss and the degree of synthesis reduction determining molecular alteration on each gene. In most cases, in the event of the loss of two  $\alpha$  genes, the phenotype is usually characterized by presenting microcytosis and hypochromia with no or slight anemia with normal Hb A<sub>2</sub> and Hb F (1).

Hb Agrinio [ $\alpha$ 29(B10)Leu→Pro, C7G>C/C (α2)] is a hyperunstable  $\alpha$  chain structural variant in which the thalassemic phenotype is determined by a post translational precipitation of the structurally anomalous chain in erythroid precursors. This would explain the absence of the abnormal globin chain in electrophoretic and chromatographic studies, even though there is no reduction of the  $\alpha$  chain synthesis (2). This study involves 14 cases from three families affected with Hb Agrinio.

## MATERIALS AND METHODS

Sixteen patients from three unrelated families (two of Gypsy ethnicity) were studied between January 2009 and December 2010 because all exhibited microcytosis. The most frequent forms of Mediterranean  $\beta$ -,  $\delta\beta$ - and  $\alpha$ -thalassemias were ruled out.

Hematological data were obtained in a hematological counter (Coulter LH750 Analyzer; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Hb A<sub>2</sub> and Hb F values were quantified by ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) (VARIANT™; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Hemoglobin was electrophoretically studied in cellulose acetate at alkaline pH, isoelectric focusing (IEF), ion exchange HPLC and globin chains by means of reversed phase HPLC. Inclusion bodies were observed by brilliant cresyl blue staining.

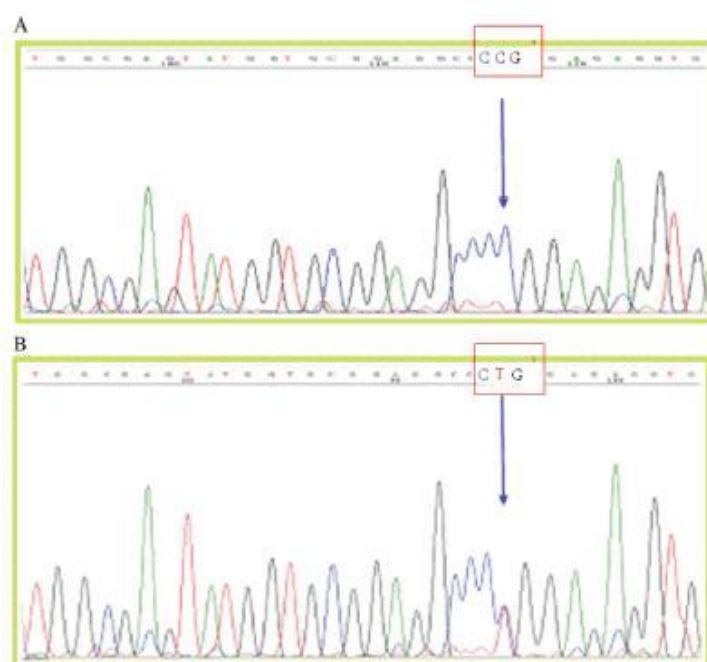
The molecular study required automatic extraction of the genomic DNA [Biorobot® EZ1; Qiagen GmbH, Hilden, Germany]. The most frequent mutations were discarded by means of  $\alpha$ -globin StripAssay and molecular characterization was undertaken using automatic sequencing in an ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The  $\alpha$ 2 gene was specifically amplified with P1A (5'-AGC GCC GCC CGG CCG GGC GT-3') and C3R (5'-CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG-3') primers, specific to the 3'UTR (3' untranslated region) of the  $\alpha$ 2-globin gene. The product of the amplification (947 bp) was sequenced with the commercial ABI PRISM™ BigDye® Kit V1.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). The primers used for the sequencing were P1A, PB (5'-CCC GCC CGG ACC CAC A-3') and P1C (5'-AGA TGG CGC CTT CCT CTC AG-3').

## RESULTS

Selective sequencing of the  $\alpha 2$  gene showed a CTG>CCG mutation at codon 29. The mutation was found in a heterozygous state in 11 cases and in a homozygous state in three cases (Figure 1). The hematimeter parameters, Hb A<sub>2</sub>, Hb F, and the  $\alpha$  genotype are summarized in Table 1. In two of the heterozygous cases, a 3.7 kb triplication of the  $\alpha$  genes was observed on the other allele.

## DISCUSSION

One of the most frequent monogenic alterations in the world is  $\alpha$ -thal, although it prevails in a considerably variable manner from region to region. It is estimated that the frequency of deletional  $\alpha$ -thal in Spain is approximately 5.0%, while cases of nondeletional  $\alpha$ -thal occur less frequently and are less than 10.0% of the total patients with  $\alpha$ -thal (1,3). Up to now, more than 70



**FIGURE 1** Direct sequencing: Hb Agrinio [ $\alpha 29$ (B10)Leu  $\rightarrow$ Pro, CTG>CCG]. A: Homozygote. B: Heterozygote.

TABLE 1 Hematological Parameters and Genotypes of the Studied Cases

Parameters	Family A				Family B			
	I-1	II-1	I-1	I-2	II-1	II-2	II-3	II-4
Sex-Age	F-37	F-20	M-39	F-37	M-16	M-14	M-8	F-12
Hb (g/dL)	13.7	13.1	15.2	13.8	14.9	15.0	9.5	12.6
MCV (fL)	73.2	71.0	78.2	84.3	82.1	78.2	74.9	65.8 <sup>a</sup>
RDW (%)	13.9	15.1	14.1	13.2	12.9	13.3	26.9	14.6
MCH (pg)	23.7	23.3	24.9	27.1	27.7	24.9	23.6	21.1
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.0	2.8	2.2	1.9	2.2	2.0	1.5	1.7
Hb F (%)	0.2	0.2	1.0	1.5	1.5	1.0	1.7	2.0
Reticulocytes (%)	1.0	1.3	0.9	2.1	0.9	0.5	6.0	1.5
Inclusion bodies	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
Genotype	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$

Parameters	Family C			
	I-1	I-3	II-1	II-2
Sex-Age	F-51	F-45	M-31	F-22
Hb (g/dL)	13.3	14.0	15.8	13.1
MCV (fL)	78.2	73.4	75.8	71.7
RDW (%)	15.9	23.8	13.9	13.4
MCH (pg)	25.0	22.8	24.3	22.9
Hb A <sub>2</sub> (%)	2.7	2.3	2.7	2.5
Hb F (%)	0.0	0.0	0.3	0.0
Reticulocytes (%)	1.1	1.1	0.9	1.1
Inclusion bodies	[-]	[-]	[-]	[-]
Genotype	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{\text{Agmiso}}\alpha/\alpha\alpha$

<sup>a</sup>Associated ferroplastic anemia.<sup>b</sup>This is a 3-month-old baby boy.<sup>c</sup>Transfused 1 week prior to being tested.



point (insertion or deletion) mutations of a few base pairs of nondeletional  $\alpha$ -thal have so far been described. Most of these molecular alterations are exclusive to some families except mutations at the initiation (start) codon, the deletion of five nucleotides at the 5' end of the IVS-I, mutations at the termination (stop) codon and mutations in the polyadenylation site (poly A) of the 3' end of the gene described relatively frequently in some populations. Most of these point mutations have been described in the  $\alpha 2$  gene for being the most expressed in the two  $\alpha$  genes (4).

Leucine is exchanged for a proline residue at position 29 of the  $\alpha 2$  chain in Hb Agrinio, which is a highly conserved residue in evolution and is fundamental for generating the indispensable hydrophobic surrounding for the distal union of the heme group. A hyperunstable  $\alpha$  chain is thus formed and undergoes an almost instantaneous post translational precipitation and is catabolized before the  $\alpha/\beta$  dimers are formed, giving rise to a reduction in the  $\alpha$  chains synthesis, resulting in a phenotypic expression of  $\alpha$ -thals (2). In all cases where a leucine residue is exchanged for a proline, an unstable Hb will occur, both in the  $\alpha$  [Hb Port Phillip or  $\alpha 91$  (FG3) (CTT>CCT) ( $\alpha 2$  or  $\alpha 1$ ), Hb Quong Sze or  $\alpha 125$  (H8), CTG>CCG ( $\alpha 2$ ), Hb Tunis-Bizerte or  $\alpha 129$  (H12), CTG>CCG ( $\alpha 1$ )] and the  $\beta$  chain [Hb Genova or  $\beta 28$  (B10) (CTG>CCG), Hb Perth or  $\beta 32$  (B14) (CTG>CCG), Hb Atlanta or  $\beta 75$  (E19) CTG>CCG, Hb Santa Ana or  $\beta 88$  (F4), CTG>CCG] (5–8). Some of these are as unstable as Hb Agrinio (Hbs Quong Sze and Tunis-Bizerte) and their presence is difficult to detect except by DNA sequencing.

The first time that Hb Agrinio was described was in three individuals of Greek-Cypriot origin with an atypical form of the Hb H disease. A molecular analysis showed that all these cases were compound Hb Agrinio heterozygotes or carrying a poly A mutation called T-Saudi (AATAAA-AATAAG), HBA2:c\*+94A>G (9). The first case of homozygous Hb Agrinio was described in a Greek child who, at 12 months old, showed marked microcytic and hypochromic anemia, a low Hb H level (<2.5%) and balanced synthesis of  $\alpha$  and non- $\alpha$  genes. At 13 years of age, the individual had a clinical phenotype compatible with an intermediate thalassemia with a Hb level of 8.7 g/dL anemia, normal growth and development, slight splenomegaly and minimum osseous changes, while neither Hb H or inclusion bodies were detected (10).

In this study, three cases displayed Hb Agrinio in a homozygous state and all had the severe intermediate phenotype of thalassemia (Hb H disease). The patients received transfusions on some occasions and all three displayed mild growth impairment. Association of Hb Agrinio with another form of thalassemia ( $\alpha^+$  or  $\alpha^0$ ) causes a severe phenotype with regular blood transfusion requirements. This fact alone justifies the incorporation of Hb Agrinio molecular testing in the prenatal diagnosis screening in countries with high prevalence of at-risk populations (11).

The 11 heterozygous Hb Agrinio carriers displayed a silent thalassemia phenotype without anemia and with discrete microcytosis superimposed on the cases with  $\alpha^+$  deletional or nondeletional heterozygous thalassemia with different mutations. Nevertheless, mean corpuscular volume (MCV) was far more reduced in two cases, which could be justified by an iron deficiency (ferritin <10 ng/mL) in both cases. In addition, two cases with Hb Agrinio in a heterozygous state, displayed a triplication of  $\alpha$  genes on the other allele, while a normalization of MCV and mean corpuscular Hb (MCH) due to possible compensation in the synthesis of the  $\alpha$  chain of the allele with the triplication was observed. However, the other patient displayed a very low MCV on being one of the cases with iron deficiency and, therefore, the possible compensating effect of the triplication could not be assessed.

These are the first cases with Hb Agrinio described in our country. The three families mentioned in this study originate from three different regions in Spain (Catalonia, Andalusia and Madrid) and all have Spanish ancestry. Two of the families are of Gypsy ethnicity, which suggests that the mutation could have had a common origin in the eastern area of the Mediterranean, in Greece or Cyprus, and spread to the western area as nomadic gypsies migrated to our country.

The description of these first cases in our country demonstrates the heterogeneity of nondeletional  $\alpha$ -thal (12). Despite being infrequent cases, the severity of the homozygote or double heterozygote cases with other  $\alpha$ -globin gene cluster molecular alterations, ranging from cases of intermediate thalassemia to Hb H hydrops fetalis cases, indicates that molecular identification of the Hb Agrinio mutation carriers must be considered in the context of the study of  $\alpha$ -thal cases or of microcytosis screening programs in order to provide correct genetic counseling.

**Declaration of Interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## REFERENCES

- ▶1. Harteveld CL, Higgs DR.  $\alpha$ -Thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):13.
- ▶2. Traeger-Synodinos J, Douna V, Papassotiriou I, *et al*. Variable and often severe phenotypic expression in patients with the  $\alpha$ -thalassemic variant Hb Agrinio [ $\alpha$ 29(B10) Leu→Pro ( $\alpha$ 2)]. *Hemoglobin*. 2010;34(5):430–438.
3. de la Fuente-Gonzalo F, Vinuesa L, Martínez-Nieto J, *et al*. Recopilación de hemoglobinopatías de cadena  $\alpha$  que cursan con microcitosis. *Haematologica*. 2010;95(2):44.
4. Bernini LF, Harteveld CL.  $\alpha$ -Thalassaemia. *Baillieres' Clin Haematol*. 1998;11(1):53–90.
- ▶5. Goossens M, Lee KY, Liebhaber SA, Kan YW. Globin structural mutant  $\alpha$ 125 Leu→Pro is a novel cause of  $\alpha$ -thalassaemia. *Nature*. 1982;296(5860):864–865.
- ▶6. Grové SS, Jenkins T, Kamuzora HL, Lehmann H. Congenital Heinz body haemolytic anaemia due to Hemoglobin Perth in a Nama child seemingly aggravated by the high nitrate content of the water supply. *Act Haematol*. 1977;57(3):143–151.

- ▶7. Tanaka Y, Séller JF, Schwart E, *et al.* Oxygen binding and stability properties of Hb Santa Ana ( $\beta 88$  LEU $\rightarrow$ PRO). *Hemoglobin*. 1985;9(2):157–169.
- ▶8. Breman SO, Shaw JC, George PM, Huisman THJ. Posttranslational modification of  $\beta 141$  Leu associated with the  $\beta 75$  (E19) Leu $\rightarrow$ Pro mutation in the Hb Atlanta. *Hemoglobin*. 1993;17(1):1–7.
- ▶9. Hall GW, Thein SL, Newland AC, *et al.* A base substitution (T $\rightarrow$ C) in codon 29 of the  $\alpha 2$  globin gene causes  $\alpha$  thalassaemia. *Br J Haematol*. 1993;85(3):546–552.
- ▶10. Traeger-Synodinos J, Metaxotou-Mavromati A, Kanavakis E, *et al.* An  $\alpha$ -thalassemic hemoglobinopathy: homozygosity for the Hb Agrinio  $\alpha 2$ -globin chain variant. *Hemoglobin*. 1998;22(3):209–215.
- ▶11. Felekis X, Phylactides M, Drousiotou A, *et al.* Hb Agrinio [ $\alpha 29$  (B10) Leu $\rightarrow$ Pro ( $\alpha 2$ )] in combination with  $-\gamma^{MED1}$  results in a severe form of Hb H disease. *Hemoglobin*. 2008;32(3):237–246.
- 12. de la Fuente-Gonzalo F, Vinuesa L, Martínez-Nieto J, *et al.* Biología Molecular de algunas hemoglobinas hiperinestables encontradas en la población española. *Haematologica* 2010;95(2):44.



## X.2.3 ASOCIACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GROENE HART CON LA HEMOGLOBINA J-PARÍS-I: PRIMER CASO EN ESPAÑA



Original

### Asociación de la hemoglobina Groene Hart con la hemoglobina J-París-I: primer caso en España

Félix de la Fuente-Gonzalo\*, Paloma Roperio, Jorge Martínez-Nieto, Ana Villegas, Fernando A. González y Joaquín Díaz-Mediavilla

Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

#### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

##### Historia del artículo:

Recibido el 21 de mayo de 2013  
Aceptado el 17 de octubre de 2013  
On-line el xxx

##### Palabras clave:

Alfatalemia no deleción  
Hemoglobinopatías hiperinestables  
español  
Marruecos

#### RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** Las talasemias son las enfermedades monogénicas más frecuentes a nivel mundial. Representan un grave problema sanitario en las regiones de mayor incidencia. Las  $\alpha$ -talasemias se deben a un déficit de síntesis de las cadenas  $\alpha$  de la hemoglobina (Hb). La Hb Groene Hart es una variante hiperinestable. En este trabajo se presentan 24 casos pertenecientes a 17 familias afectadas por la Hb Groene Hart, uno de ellos asociado con Hb J-París-I.

**Pacientes y métodos:** Veinticuatro pacientes de 17 familias no relacionadas fueron incluidos en este estudio. La caracterización se realizó mediante secuenciación.

**Resultados:** La secuenciación del gen  $\alpha 1$  mostró la mutación CCT→TCT (Pro→Ser) en el codón 119 (Hb Groene Hart). En un paciente se asoció con la Hb J-París-I.

**Conclusiones:** En la Hb Groene Hart se encuentra afectado un residuo clave para preservar la estabilidad de las cadenas  $\alpha$  de globina. La presencia de esta variante es elevada en población española e inmigrante. La aparición de formas graves de la enfermedad podría ser evitada incorporando esta mutación al cribado de las mutaciones  $\alpha$ -talasemia no deleción.

© 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Association between hemoglobin Groene Hart and hemoglobin J-Paris-I: First case in Spain

#### ABSTRACT

**Background and objective:** Thalassemias are the most frequent monogenic disorder around the world.  $\alpha$ -thalassemias are due to a deficiency of synthesis in the alpha-globin chain of the hemoglobin (Hb). Hb Groene Hart is a hyperunstable variant. In this work, we have studied 24 cases affected by Hb Groene Hart, one of them associated with Hb J-Paris-I.

**Patients and methods:** Twenty-four patients from 17 unrelated families were included in this study. The characterization was done by sequencing.

**Results:**  $\alpha 1$  gene sequencing showed the mutation CCT→TCT (Pro→Ser) at codon 119 (Hb Groene Hart) in all patients. In one case, there was an association with Hb J-Paris-I.

**Conclusions:** In the Hb Groene Hart, the residue 119 of alpha-globin chain is affected. This amino acid has a key role in preserving the stability of alpha-globin chain. It is also remarkable the presence of this variant in both the immigrant and native population. Thus, the identification of Hb Groene Hart carriers should be considered in the screening of  $\alpha$ -thalassemia in Spain, as it is done in Northern Africa.

© 2013 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Introducción

Las talasemias son las alteraciones monogénicas más frecuentes a nivel mundial, representando un grave problema sanitario en las

zonas donde la incidencia es mayor. Las  $\alpha$ -talasemias se deben a una deficiencia o ausencia de síntesis en la cadena  $\alpha$  de la hemoglobina (Hb), y se caracterizan por una anemia microcítica e hipocroma<sup>1</sup>. Sus principales mecanismos moleculares son las grandes deleciones. Sin embargo, en torno a un 5-10% de las  $\alpha$ -talasemias son debidas a mutaciones puntuales ( $\alpha$ -talasemia no deleción), que ocasionan un defecto en la transcripción, traducción o en el procesamiento

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: felixfueg@hotmial.com (F. de la Fuente-Gonzalo).

## X.2.4 HB CIBELES [ $\alpha_2$ CD25(B6) (Gly→Asp)]: A NOVEL ALPHA CHAIN VARIANT CAUSING ALPHA-THALASSEMIA

Int J Hematol  
DOI 10.1007/s12185-014-1663-2

### CASE REPORT

#### Hb Cibeles [ $\alpha_2$ CD25(B6) (Gly → Asp)]: a novel alpha chain variant causing alpha-thalassemia

Félix de la Fuente-Gonzalo · Jorge M. Nieto · Lara Vinuesa · Julián Sevilla · Joaquín Díaz-Mediavilla · Ana Villegas · Fernando A. González · Paloma Ropero

Received: 25 April 2014 / Revised: 29 August 2014 / Accepted: 1 September 2014  
© The Japanese Society of Hematology 2014

**Abstract** Thalassemias are the most frequent monogenic disorders around the world and are a serious health problem in areas with a high incidence. Thalassemias are particularly frequent in Mediterranean countries, the Middle East, Africa, the Indian subcontinent, and in the Southeast Asia. Of these,  $\alpha$ -thalassemia is inherited as an autosomal recessive disorder.  $\alpha$ -thalassemias are due to a deficiency or absence of hemoglobin (Hb)  $\alpha$ -chain synthesis and are characterized by microcytic and hypochromic cells anemia and a clinical phenotype varying from nearly asymptomatic to a lethal hemolytic anemia. Compound heterozygotes and some homozygotes have a moderate to severe form of  $\alpha$ -thalassemia called HbH disease. Hb Bart's hydrops foetalis is a lethal form in which no  $\alpha$ -globin chain is synthesized. In this study we show a new structural variant of  $\alpha$ -chain, Hb Cibeles [ $\alpha_2$  CD25(B6) Gly → Asp], in heterozygous state, which was undetectable by electrophoretic or chromatographic methods. Hb Cibeles is thus a hyper-unstable hemoglobinopathy. In this new globin chain variant, an apolar amino acid is replaced by a negatively charged amino acid. This change may be responsible for the molecular hyper-instability similar to the mutation in the adjacent residues.

**Keywords** Anemia · Thalassemia · Nondeletional  $\alpha$ -thalassemia · Hyper-unstable hemoglobinopathy

F. de la Fuente-Gonzalo (✉) · J. M. Nieto · L. Vinuesa · J. Díaz-Mediavilla · A. Villegas · F. A. González · P. Ropero  
Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: felixfuenteg@hotmail.com

J. Sevilla  
Servicio de Oncohematología pediátrica, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

### Introduction

One of the most frequent monogenetic disorders is thalassemias and are a serious health problem in those areas with a high incidence. This is because carriers of  $\alpha$ -thalassemia are thought to be at a selective advantage in areas where falciparum malaria is or has been endemic. In areas where the carrier state is common, two clinically important diseases (HbH disease and Hb Bart's hydrops foetalis) occur in compound heterozygotes and homozygotes.  $\alpha$ -thalassemias are due to a deficiency ( $\alpha^+$ ) or absence ( $\alpha^0$ ) of hemoglobin (Hb)  $\alpha$ -chain synthesis and are characterized by microcytic and hypochromic cells anemia [1]. Affected individuals have a variable degree of anemia, reduced mean corpuscular Hb (MCH), reduced mean corpuscular volume (MCV) and a normal level of Hb A<sub>2</sub>.

Most  $\alpha$ -thalassemias molecular mechanisms are deletions of one or both  $\alpha$ -globin genes and less than 5.0–10.0 % are point mutations (nondeletional  $\alpha$ -thalassemias) that may affect RNA transcription, post transcriptional processing, mRNA translation or  $\alpha$ -globin instability [2]. The latter mechanism causes the hyper-unstable Hb. They cannot be detected by electrophoretic or chromatographic methods.

Here, we show a new structural variant of  $\alpha$ -chain in heterozygous state.

### Case report

The carrier was an adopted Ethiopian 4-year-old male subject whose biological parents are not available. The children at the time of the study had microcytosis (MCV 70.1 fL) and hypochromy (MCH 22.6 pg) with both normal Hb A<sub>2</sub> (2.6 %) and Hb F (0.5 %) but without iron

Published online: 12 September 2014

 Springer



## X.2.5 HB BURGOS ( $\alpha_1$ CD64(E13)(Asp→Asn)): UNA NUEVA VARIANTE DE HEMOGLOBINA DETECTADA DURANTE LA MONITORIZACIÓN DE LA DIABETES

G Model  
MEDCLI-3120; No. of Pages 4

ARTICLE IN PRESS

Med Clin (Barc). 2014;xxx(x):xxx-xxx



MEDICINA CLÍNICA

www.elsevier.es/medicinaclinica



### Nota clínica

### Hb Burgos ( $\alpha_1$ CD64(E13)(Asp→Asn)): una nueva variante de hemoglobina detectada durante la monitorización de la diabetes

Félix de la Fuente-Gonzalo<sup>a,\*</sup>, Jorge Martínez Nieto<sup>a</sup>, María José Torrejón<sup>b</sup>, Luis Antonio Mayor<sup>c</sup>, Diego Velasco<sup>d</sup>, Fernando Ataulfo González Fernández<sup>a</sup> y Paloma Ropero Gradilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

<sup>b</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

<sup>c</sup>Servicio de Hematología, Hospital Reina Sofía, Tudela, Navarra, España

<sup>d</sup>Laboratorio BR Salud, Madrid, España

#### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

##### Historia del artículo:

Recibido el 17 de febrero de 2014

Aceptado el 21 de julio de 2014

On-line el xxx

##### Palabras clave:

Hemoglobinopatía estructural

Hemoglobina glucosilada

Secuenciación

Diabetes mellitus

#### RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** El control de la diabetes mellitus se realiza mediante la determinación de hemoglobina glucosilada (HbA<sub>1c</sub>) por cromatografía líquida de alta resolución. Algunas variantes estructurales de la hemoglobina (Hb) son conocidas por causar interferencia analítica en la medición de la HbA<sub>1c</sub>.

**Pacientes y métodos:** En este estudio se ha caracterizado una nueva variante de Hb en 4 pacientes, que se detectó al realizarse un control de HbA<sub>1c</sub>.

**Resultados:** La secuenciación selectiva del gen  $\alpha 1$  mostró una mutación responsable del cambio de ácido aspártico (Asp) por asparagina (Asn) en el codón 64. El cambio de Asp por Asn no produce ninguna alteración funcional de la Hb y se comporta como una hemoglobinopatía silente.

**Conclusión:** Las variantes estructurales de la Hb se pueden detectar durante la medición de la HbA<sub>1c</sub> y pueden alterar sus valores. Estos casos, aunque poco frecuentes, requieren examinar a fondo los cromatogramas para detectar posibles interferencias.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Hb Burgos ( $\alpha_1$ CD64(E13)(Asp→Asn)): A new hemoglobin variant detected during follow-up of diabetic patients

#### ABSTRACT

**Background and objective:** The glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) test by high performance liquid chromatography is a useful tool for the follow-up of diabetes mellitus patients. Some structural hemoglobin (Hb) variants are known to cause interference in the analytical measurement of HbA<sub>1c</sub>.

**Patients and methods:** In this study, it has been characterized a new Hb variant in 4 patients during their regular control of HbA<sub>1c</sub>.

**Results:** Selective  $\alpha 1$  gene sequencing showed a mutation GAC > AAC at codon 64 within exon 2. This produces a change of aspartic acid (Asp) by asparagine (Asn) that does not produce any functional alteration so the resultant molecule behaves as a silent hemoglobinopathy.

**Conclusion:** The structural Hb variants can be detected during the analysis of HbA<sub>1c</sub> and may alter its values. Though rare, this occurrence signals the need to being aware when measuring HbA<sub>1c</sub>.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: felixfuenteg@hotmail.com (F. de la Fuente-Gonzalo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.07.035>

0025-7753/© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: de la Fuente-Gonzalo F, et al. Hb Burgos ( $\alpha_1$  CD64(E13)(Asp→Asn)): una nueva variante de hemoglobina detectada durante la monitorización de la diabetes. Med Clin (Barc). 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.07.035>

## X.2.6 HB NUNOBIKI [ $\alpha_2$ 141 (HC3) Arg>Cys; HBA2:c.424C>T] IN SPAIN: MUTATION DE NOVO OR ACQUIRED?



## Research Article

## Open Access

### Hb Nunobiki [ $\alpha_2$ 141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation *de novo* or Acquired?

Ropero P<sup>1\*</sup>, González-Borrachero ML<sup>2</sup>, Peña A<sup>3</sup>, González FA<sup>1</sup>, Fuente-Gonzalo F de la<sup>1</sup>, Martínez J<sup>1</sup>, Vinuesa L<sup>1</sup>, Villegas A<sup>1</sup> and Díaz-Mediavilla J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Jerez, Cádiz, Spain

<sup>3</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

#### Abstract

The most common hemoglobin arose as an adaptation to the environment and its expansion was carried out by mechanisms of gene flow and population growth related to the social changes of habits of mankind. Other hemoglobinopathies (Hbs) to have low prevalence and appear in population studies of Hb or glycosylated hemoglobin (Hb A1c). Most of these Hbs have been identified in isolation and individually, others in a few families, considering these cases *de novo* mutations or that the mutated gene has been transported inadvertently. An example is Hb Nunobiki, discovered in Japan and Belgium. We report 7 cases from four families in Andalusia, identified during the quantification of Hb A1c.

In all cases, both by capillary electrophoresis and ion exchange HPLC (II-HPLC), HBX appeared faster than HbA. By reverse phase HPLC eluted globin chain slower than  $\alpha^+$ ,  $\alpha^+$ . Sequencing of gene  $\alpha 2$  shown the substitution (CGT>TGT) in exon 3 CD141(Arg>Cys)→Hb Nunobiki.

This hemoglobin has increased affinity for oxygen but was not detected by polycythemia due to the low percentage of variant since it is  $\alpha$  chain, but because it showed during the determination of Hb A1c. This fact confirms that the II-HPLC is the gold standard for identification of hemoglobinopathies.

The quantification of Hb A1c, by HPLC can identify structural Hb variants that otherwise would not have been detected and are clinically silent but may help clarify the evolution, adaptation and distribution of hemoglobin to the medium.

**Keywords:** Genetic disorders; Hb nunobiki

#### Introduction

Common hemoglobinopathies are those genetic alterations of the hemoglobin (Hb) whose prevalence rates exceed 1% of the population of any given region of the world. HbS, Hb C, Hb E,  $\alpha$  thalassemia and  $\beta$  thalassemia are the most frequent monogenic disorders in the world and are an important public health issue.

These common hemoglobinopathies seem to appear as an adaptation to the environment. Their populations of origin were subject to positive selection, because heterozygotes got protected against *Plasmodium falciparum* [1] malaria.

These genes are expanded by genetic drift mechanisms and driven by major events in human history. Thus, the development of agriculture and the subsequent appearance of the first human settlements contributed suitable conditions to consolidate malaria as a holoendemic disease, as well as the endemicity of the genes of these hemoglobinopathies [2].

The explorations of the coasts of Africa, the discovery of America in the 15th century and its subsequent colonization were significant driving forces behind slave trade to these regions. Over the following centuries, England and most other European nations (Spain, the Netherlands, Denmark, France...) set sail to the American colonies. The triangular trade of black slaves took off since then and so did the spreading of these pathological genes to new areas. Travelers to and from the East Indies also contributed to spread these genes [3].

In fact, the first clinically recognized hemoglobinopathy was Hb S, discovered in Chicago by James Herrick back in 1910 when he observed sickle-shaped red blood cells in the blood of a black

Jamaican student with anemia [4]. However, there is a different type of hemoglobinopathies, silent in most cases, with very low prevalence rates that get reported in common hemoglobinopathies studies or in studies of glycosylated hemoglobin in diabetics patients. Most of these variants have been identified in isolation, some others across a limited number of families that, in some cases, are not geographically close to each other. These last cases are credited to *de novo* mutations or to instances on which the gene mutation has been carried involuntarily [5].

A good example of this kind of distribution and spreading is Hb Nunobiki. The first case of Hb Nunobiki was reported in 1985 on a Japanese male [6]. Eleven years later, a second case was reported on a Belgian woman with no Japanese background, which would suggest an instance of *de novo* mutation [7]. In this paper, we are reporting 7 cases of Hb Nunobiki found in four families located in the same region in Spain (Andalusia).

\*Corresponding author: Dr. Paloma Ropero, Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain, E-mail: [proper.hoso@saiaud.madrid.org](mailto:proper.hoso@saiaud.madrid.org)

Received July 02, 2013; Accepted September 18, 2013; Published September 27, 2013

Citation: Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la FGF, et al. (2013) Hb Nunobiki [ $\alpha_2$  141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation *de novo* or Acquired? J Genet Syndr Gene Ther 4: 180. doi:10.4172/2157-7412.1000180

Copyright: © 2013 Ropero P, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



Citation: Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la FGF, et al. (2013) Hb Nunobiki [ $\alpha_2$  141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or Acquired? J Genet Syndr Gene Ther 4: 180. doi:10.4172/2157-7412.1000180

Page 2 of 4

## Material and Methods

Between January 2011 and April 2012 we detected an interference in the measurements of Hb A<sub>2</sub>, using a VARIANT™ II TURBO Hemoglobin Testing System for HbA<sub>2</sub> kit 2.0 (Bio-Rad) in 7 diabetic patients (4 women and 3 men), from four families, living in Andalusia (Spain).

Hematological data were obtained in a hematological counter (Coulter LH750 Analyzer; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Hb A<sub>2</sub> and Hb F values were quantified by ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) (VARIANT™; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Hemoglobin (Hb) was studied using capillary electrophoresis (MiniCap Haemoglobin (E); Sebia, Evru Cedex, France) as well as ion exchange HPLC; finally, the globin chains were separated by reversed phase HPLC using a Vydac large pore C4 column (The Separations Group, Hesperia, CA, USA) and a linear gradient from 47 to 100.0% of phase B in 80 min. at a flow-rate of 0.8 mL/min [8].

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using an automated method [Bio-Robot® EZ1 (Quiagen GmbH, Hilden, Germany)].

Molecular characterization was undertaken using automatic sequencing in an ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The  $\alpha_2$  gene was specifically amplified with P1A (5'-AGC GCC GCC CGG CCG GGC GT-3') and C3R [5'-CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG-3'] primers, specific to the 3'UTR (3' untranslated region) of the  $\alpha_2$ -globin gene]. The product of the amplification was sequenced with the commercial ABI PRISM™ BigDye® Kit V1.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used for the sequencing were P1A, PB (5'-CCC GCC CGG ACC CAC A-3') and P1C (5'-AGA TGG CGC CTT CCT CTC AG-3').  $\alpha$ -thalassemia was ruled out by  $\alpha$ -globin StripAssay (ViennaLab Diagnostic GmbH, Vienna, Austria).

## Results

Hematological data for the 7 patients are listed in Table 1. None of the patients carried a  $\alpha$ -globin gene triplication, nor were any of the most common nondeletional or point mutation  $\alpha$ -thal determinants present. There were not microcytosis or hypochromia.

In all patients a fast-moving abnormal hemoglobin was detected both capillary electrophoresis and ion exchange HPLC (Hb X; Hb A

and Hb A<sub>2</sub>) (Figure 1a,b). By reversed phase HPLC a slower moving  $\alpha^x$  chain (10-13% of the total  $\alpha$  globin chain) (Figure 1c).

The  $\alpha_2$  gene was amplified by PCR and 947 bp of  $\alpha_2$  gene were sequenced from 44 bp upstream of the DNA Cap site to 157 bp downstream of the termination site including the three exons and two introns. Sequence analysis showed a single base substitution (C>T) at codon 141 of exon 3. This alters the normally encoded arginine to cysteine (CGT>TGT), which is identified as Hb Nunobiki (Figure 2).

## Discussion

Hemoglobinopathy distribution does not follow specific patterns, and Hb Nunobiki is testament to this. The first case reported in Japan, in 1985, probably was a de novo mutation. In the second reported case, the Belgian patient had no known relatives of Japanese descent, and therefore, this Hb would likely be the result of an independent mutation [6,7]. The seven cases reported in Spain were located in the same region (Andalusia), and could all have their origin on the same gene mutation whose involuntary dispersion might be related to a specific event occurred at some point in the distant past. During the 17<sup>th</sup> century, trade routes to and from the West and East Indies were led by the Spanish Crown, and Seville was the most important port and the place where people from every nation came to do business [9]. Between 1613 and 1620, Samurai Hasekura Rokuemon Tsunenaga led a diplomatic mission to Europe, crossing the Pacific and Atlantic oceans. They set foot in Europe in 1614 navigating the Guadalquivir River to Seville. Their mission lasted two years and, in 1618, the Japanese embassy returned to its country using the same port. But some members of the diplomatic mission decided to stay in Andalusia, more specifically in the province of Seville [10]. All the Hb Nunobiki cases reported were found in this very province. The incidence is too high for all seven to be considered de novo mutations, so we need to consider the origin of these cases to be on a gene inherited by diffusion or to be of different genetic origin.

Hb Nunobiki is a variant whose oxygen affinity is increased because the affected amino acid is residue 141 (Arg>Cys) and the COOH-terminal arginines of the alpha chains play a major role in normal human hemoglobin (HbA), both by electrostatic interactions which constrain deoxygenated hemoglobin in a low affinity quaternary conformation and by involvement in oxygen-linked anion binding known to give rise to a large part of the alkaline Bohr effect [6]. In spite of this, the cases reported by clinical literature display hematologic parameters that are on the upper limit of normal without pathological implications [6,7]. In this work, we have not been able to perform the functional study of hemoglobin by P<sub>50</sub> determination, but the same behavior has been observed in our patients, whose Hb Nunobiki was detected because it appeared as an interference during Hb A<sub>2</sub> determination (not due to the presence of polyglobulia or abnormal hematological parameters), which reveals that clinically silent hemoglobins can be found while quantifying glycosylated hemoglobin by on-Exchange HPLC. This can be relevant to prevent false Hb A<sub>2</sub> values, on the one hand, and for genetic prophylaxis purposes, on the other hand. This confirms that the ion-exchange HPLC is the gold standard for the identification of hemoglobinopathies [11,12].

Erythrocytosis remains at minimum levels probably due to the fact that, being this an  $\alpha$  chain variant, Hb Nunobiki relative weight on total hemoglobin is limited, although it can vary depending on the quantification technique applied. Ion-exchange HPLC, for instance, yields higher Hb Nunobiki percentage values (25.1-18.5%), since it is eluted together with Hb A<sub>2</sub>, while capillary electrophoresis fails to detect Hb A<sub>2</sub> and quantifies Hb Nunobiki only (14.1-10%).

	IA1 F	IA1 M	IA2 F	IB1 F	IC1 M	ID1 F	IE1 M
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	4.8	5.1	4.7	5.2	4.4	4.9	5.7
Hb (g/dL)	14.2	15.4	14	15.1	15.3	15.5	16.5
PCV (L/L)	0.42	0.45	0.44	0.46	0.46	0.48	0.53
MCV (fL)	87.8	88.5	92.6	88.0	105.9	97.5	91.6
MCH (pg)	29.5	30.1	29.5	28.8	35.0	31.6	28.9
MCHC (g/dL)	33.6	34	31.9	32.8	33.0	32.4	31.6
RDW (%)	14	13.4	12.9	13.7	15.5	13.9	15
Hb F (%)	1.2	0.9	1.2	1.0	1.0	0.6	1.6
Hb A <sub>2</sub> (%)	1.8	2.0	2.0	2.0	1.8	2.5	7.2
Hb X+ HbA <sub>2</sub> (%) (VARIANT™II TURBO) ( $\beta$ -Thal Program)	25.1	22.4	22.1	19.7	18.5	18.6	18.6
HbX (%) (Capillary Electrophoresis)	13.6	10.3	12.9	10.4	14.1	10	12.7

F: Female; M: Male

Table 1: Hematological data.

Citation: Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la FGF, et al. (2013) Hb Nunobiki [ $\alpha_1$  141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or Acquired? J Genet Syndr Gene Ther 4: 180. doi:10.4172/2157-7412.1000180

Page 3 of 4

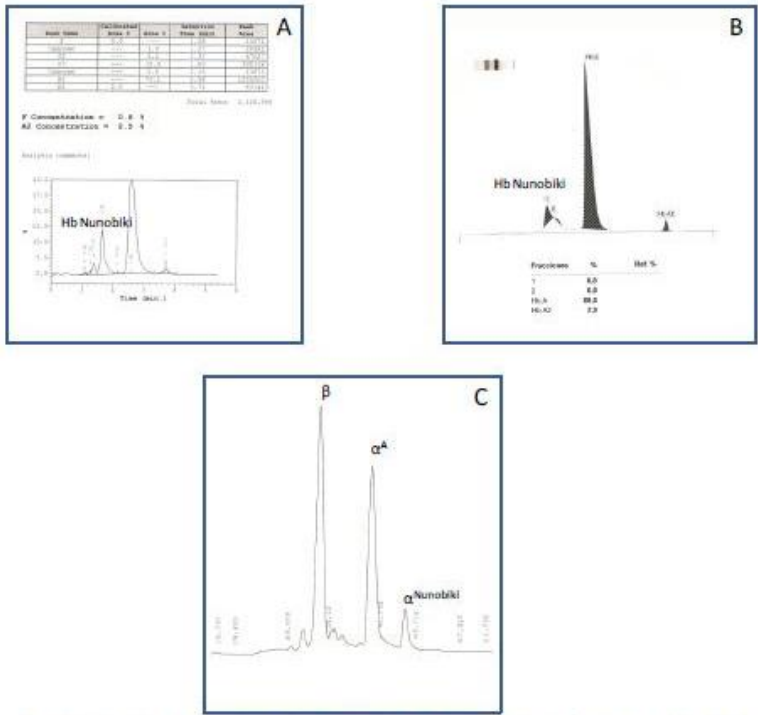


Figure 1: Different chromatograms, A: Ion exchange HPLC (Variant). B: capillary electrophoresis. C: reversed phase HPLC.

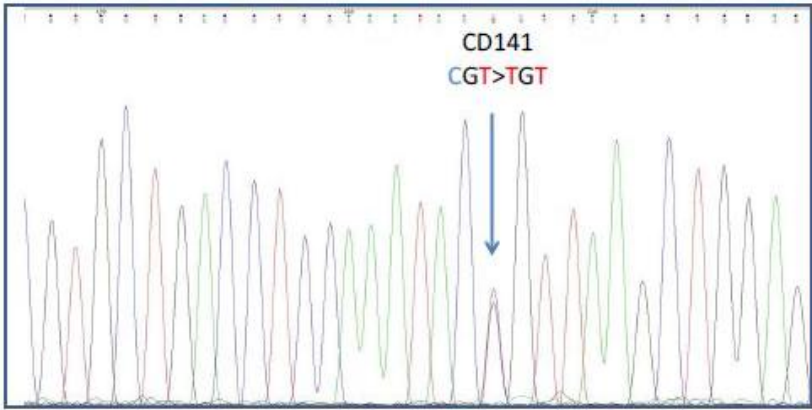


Figure 2: Direct automated sequencing of exon 3 of  $\alpha_2$  gene showing Hb Nunobiki [codon 141 (CGT>TGT) Arg→Cys].



Citation: Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la FGF, et al. (2013) Hb Nunobiki [ $\alpha_2$  141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or Acquired? *J Genet Syndr Gene Ther* 4: 180. doi:10.4172/2157-7412.1000180

Page 4 of 4

Five additional variants have been reported at CD 141(HC3) of the  $\alpha$  chain: J-Camaguey [Arg>Gly; HBA2:c.424C>G]; Singapore [Arg>Pro; HBA2:c.425G>C]; Cubujuqui [Arg>Ser; HBA2:c.424C>A]; Legnano [Arg>Leu; HBA2:c.425G>T] and Suresnes [Arg>His; HBA2:c.425G>A] [13-17]. No hemoglobin functional study was conducted for the first two variants (J-Camaguey; Singapore), while the other three are high oxygen affinity variants, like Hb Nunobiki. All five variants display no hematological abnormality in heterozygous state and, consequently, the percentage of abnormal hemoglobin is 20-25%. The high oxygen affinity might be explained by a similar mechanism to that of the Hb Nunobiki.

Unlike the Histidine 146 of the globin  $\beta$  chain, the Arginine 141 of the globin  $\alpha$  chain does not increase the Bohr effect, even though they are equivalent positions. The Arg  $\alpha$  141 side chains are squeezed out aided by a weakening of the Tyr 140 hydrogen bond as with the  $\beta$  chain, and the bond 141 Arg  $\alpha_1$ -127Lys $_2$  is broken.

In Hb Nunobiki, the replacement of the last amino acid of the outer surface of the  $\alpha$  chain C-terminal region terminal -Arginine (basic) with Cysteine (ambivalent), implies the modification of its electrical charge, which contributes ease of detection by electrophoresis of any kind.

Thanks to new HPLC programs, it is possible to identify hemoglobin structural variants that would not be detected otherwise while quantifying Hb A $_{1c}$ . Although clinically silent, these variants can help clarify the evolution, distribution and adaptation of hemoglobin to the environment.

#### References

- Weatherall DJ, Clegg JB (2001) The Thalassemia Syndromes. (4th edn). Oxford, Blackwell Science.
- Livingstone FB (1966) Anthropological aspects of the distributions of the human hemoglobin variants. In: Winter WP, (edn) Hemoglobin variants in human populations. Boca Raton, Florida, CRC Press: 17-28.
- Minchinton, Walter E (1979) "The Triangular Trade Revisited." Henry A Gemery, Jan S Hogendorn, In The Uncommon Market: Essays in the Economic History of the Atlantic Slave Trade. New Academic Press, New York.
- Hemlock JB (2001) Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med* 74: 179-184.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrino GP, et al. (2002) HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 19: 225-233.
- Shimasaki S (1985) A new hemoglobin variant, hemoglobin Nunobiki [alpha 141 (HC3) Arg→Cys]. Notable influence of the carboxy-terminal cysteine upon various physico-chemical characteristics of hemoglobin. *J Clin Invest* 75: 695-701.
- Kazanietz EG, Leonova JY, Huisman TH, van der Dijk FP, Smit JW (1996) Hb Nunobiki or alpha 2 141 (HC3)Arg→Cys beta 2 in a Belgian female results from a CGT→TGT mutation in the alpha 2-globin gene. *Hemoglobin* 20: 443-445.
- Shelton JB, Shelton JR, Schroeder WA (1964) High performance liquid chromatographic separation of globin chains on a large-pore C4 column. *J Liq Chromatogr* 7: 1969-1977.
- Castillo Pintado A (1989) El Gran Comercio: puertos, rutas, tráfico. En: Historia de España, La crisis del siglo XVII. La Población, la Economía, la Sociedad. Espasa Calpe, Madrid.
- Orlón Junqueras I Vies, Dani Madrid I Morales, Guillermo Martínez Taberner, y Pau Pitarach Fernández (2012) Historia de Japón, Economía, política y sociedad.
- Gosselin RC, Carlin AC, Dwyre DM (2011) Comparison of the BioRad Variant and Primus Ultra2 high-pressure liquid chromatography (HPLC) instruments for the detection of variant hemoglobins. *Int J Lab Hematol* 33: 159-167.
- Lahousen T, Roller RE, Lipp RW, Schnedi WJ (2002) Silent haemoglobin variants and determination of HbA $_{1c}$  with the HPLC Bio-Rad Variant II. *J Clin Pathol* 55: 699-703.
- Martínez G, Lima F, Residenti C, Colombo B (1978) Hb J Camaguey alpha 2 141(HC3) Arg replaced by Gly beta 2: a new abnormal human hemoglobin. *Hemoglobin* 2: 47-52.
- Clegg JB, Weatherall DJ, Boon WH, Mustafa D (1969) Two new haemoglobin variants involving proline substitutions. *Nature* 222: 379-380.
- Moo-Penn WF, Therrell BL Jr, Jue DL, Johnson MH (1981) Hemoglobin Cubujuqui (alpha 141 Arg-Ser): functional consequences of the alteration of the C-terminus of the alpha chain of hemoglobin. *Hemoglobin* 5: 715-724.
- Mavilio F, Martucci M, Tentori L, Fontanarosa PP, Rossi U, et al. (1978) Hemoglobin Legnano (alpha2 141 (HC3) Arg replaced by Leu beta2): a new abnormal human hemoglobin with high oxygen affinity. *Hemoglobin* 2: 249-259.
- Poyart C, Bursaux E, Amone A, Bonaventura J, Bonaventura C (1980) Structural and functional studies of hemoglobin Suresnes (arg 141 alpha 2 replaced by His beta 2). Consequences of disrupting an oxygen-linked anion-binding site. *J Biol Chem* 255: 9465-9473.

Citation: Ropero P, González-Borrachero ML, Peña A, González FA, de la FGF, et al. (2013) Hb Nunobiki [ $\alpha_2$  141(HC3) Arg→Cys; HBA2:c.424C>T] in Spain: Mutation de novo or Acquired? *J Genet Syndr Gene Ther* 4: 180. doi:10.4172/2157-7412.1000180

This article was originally published in a special issue, [Genetic Disorders](#) handled by Editor(s). Dr. Xiaobo Li, Yeshiva University, USA

#### Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

##### Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

##### Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at <http://www.editorialmanager.com/omjagroup/>

## X.2.7 DELTA<sup>0</sup>-TALASEMIA POR INSERCIÓN DE 27 PARES DE BASES EN EL GEN $\delta$ -GLOBINA CON DESCENSO DE LOS VALORES DE HEMOGLOBINA A<sub>2</sub>

Med Clin (Barc). 2015;144(7):312-316



MEDICINA CLÍNICA

www.elsevier.es/medicinaclinica



### Nota clínica

### Delta<sup>0</sup>-talasemia por inserción de 27 pares de bases en el gen $\delta$ -globina con descenso de los valores de hemoglobina A<sub>2</sub>



Maria Luisa González Borrachero<sup>a</sup>, Félix de la Fuente-Gonzalo<sup>b</sup>, Fernando Ataúlfo González<sup>b</sup>, Jorge M. Nieto<sup>b</sup>, Ana Villegas<sup>b</sup> y Paloma Ropero<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Bioquímica, Hospital de Jerez, Jerez, Cádiz, España

<sup>b</sup> Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 17 de julio de 2014  
Aceptado el 23 de octubre de 2014  
On-line el 8 de enero de 2015

#### Palabras clave:

Delta-talasemia  
Hemoglobinopatías estructurales  
España  
Diagnósticos moleculares

### RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** Se describe una nueva mutación en el gen  $\delta$ -globina (delta-talasemia), responsable de una disminución de los valores de hemoglobina (Hb) A<sub>2</sub> y asociada a Hb Watts, variante de Hb debido a una delección de trinucleótidos.

**Pacientes y método:** El análisis de Hb se llevó a cabo mediante *high performance liquid chromatography* (HPLC, «cromatografía líquida de alta resolución») de intercambio iónico y electroforesis capilar de zona. Se utilizaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación automática para identificar las mutaciones en los genes  $\delta$ - y  $\alpha$ -globina.

**Resultados:** La Hb anómala se observó en la electroforesis capilar de zona en Z6 y por HPLC de intercambio iónico apareció un pico más lento que la HbA en un tiempo de retención de 4,19 min. Esta variante de la Hb se llama Hb Watts [ $\alpha$ 2 74(EF3) Asp->0 o  $\alpha$ 2 75(EF4) Asp->0; HBA2:c.226\_228-delGAC]. El bajo porcentaje de HbA<sub>2</sub> se debe a una inserción de 27 nt entre los nucleótidos 83 y 84 de IVS-1 del gen de  $\delta$ -globina.

**Conclusiones:** Cuando se analiza un cromatograma se debe tener en cuenta la posibilidad de una delta-talasemia o una variante de HbA<sub>2</sub>, aparte de una alfa-talasemia, beta-talasemia y hemoglobinopatías estructurales. A tal fin, cada uno de los picos y sus porcentajes deben ser considerados para una correcta interpretación y evitar diagnósticos erróneos tanto como sea posible.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Delta<sup>0</sup>-thalassemia by insertion of 27 base pairs in $\delta$ -globin gene with decreased hemoglobin A<sub>2</sub> levels

#### ABSTRACT

**Background and objective:** We describe a novel delta-thalassemia mutation causing decreased hemoglobin (Hb) A<sub>2</sub> levels associated with Hb Watts, variant Hb resulting from a trinucleotide deletion in Spain.

**Patients and method:** Hb variant analysis was performed by cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary zone electrophoresis. Polymerase chain reaction and DNA sequence analyses were used to identify mutations in the  $\delta$ - and  $\alpha$ -globin genes.

**Results:** Abnormal Hb was observed on capillary zone electrophoresis in Z6 and by cation-exchange HPLC a slower peak than HbA was observed at a retention time of 4.19 min. This variant Hb is called Hb Watts [ $\alpha$ 2 74(EF3) Asp->0 or  $\alpha$ 2 75(EF4) Asp->0; HBA2:c.226\_228delGAC]. The decreased HbA<sub>2</sub> percentage owes to an insertion of 27 nt between nt 83 and 84 of IVS-1 of the  $\delta$ -globin gene.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: paloma.ropero@salud.madrid.org (P. Ropero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.10.021>

0025-7753/© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.



## X.2.8 HB CERVANTES, HB MARAÑÓN, HB LA MANCHA AND HB GOYA: DESCRIPTION OF 4 NEW HAEMOGLOBINOPATHIES



### Hb Cervantes, Hb Marañón, Hb La Mancha and Hb Goya: Description of 4 new haemoglobinopathies

Félix de la Fuente-Gonzalo <sup>a,\*</sup>, Jorge M. Nieto <sup>a</sup>, Pilar Ricard <sup>b</sup>, Javier Anguita <sup>c</sup>, Rosalina Martínez <sup>d</sup>, Aurea Cervera <sup>e</sup>, Ana Villegas <sup>a</sup>, Fernando A. González <sup>a</sup>, Paloma Ropero <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Hematología, Hospital Fundación de Alcorcón, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Oncología Infantil, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain

<sup>e</sup> Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Móstoles, Madrid, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 4 December 2014

Received in revised form 23 April 2015

Accepted 24 April 2015

Available online 2 May 2015

##### Keywords:

Structural haemoglobinopathy

Alpha-thalassemia

Sequencing

Anaemia

Ion exchange HPLC

Reverse phase HPLC

Capillary zone electrophoresis

#### ABSTRACT

**Objectives:**  $\alpha$ -thalassemias are caused by a deficiency in or absence of synthesis of the  $\alpha$ -chain of haemoglobin (Hb). In contrast, structural haemoglobinopathies are due to mutations that change the amino acid sequence of the protein chain.

We report 4 newly identified  $\alpha$ -chain Hb variants. Two variants were hyper-unstable, whereas the other 2 were structural variants with an altered electrophoretic mobility.

**Design and methods:** The first 2 families were identified because of microcytosis and hypochromia with a normal Hb A<sub>2</sub> and Hb F but without iron deficiency. The other 2 families came to scrutiny because of a peak of abnormal Hb during routine analytical assays. These Hb variants were characterized by specific sequencing.

**Results:** The hyper-instability of Hb Cervantes is probably due to its lower affinity for the alpha chain haemoglobin-stabilizing protein (AHSP). Hb Marañón is another unstable Hb variant that produces an  $\alpha$ -thalassemia phenotype. For the identification of Hb La Mancha, a molecular characterization by sequencing was required. Finally, Hb Goya was found to have the same electrophoretic mobility as Hb J. A lower percentage of the variant was obtained due to a possible component of instability, though the patient did not show evidence of anaemia.

**Conclusion:** These variants of Hb add to the variety and complexity of disorders of the genes that encode Hb.  
© 2015 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

#### Introduction

Haemoglobinopathies are a group of inherited disorders in which the production of haemoglobin (Hb) is altered either as a result of a quantitative (thalassemias) or a qualitative defect (structural haemoglobinopathies).

Thalassemias are the most common monogenic disorder worldwide and represent a serious health problem in countries where their incidence is high [1]. Alpha-thalassemias are caused either by a deficiency or absence of the synthesis of the  $\alpha$ -chain of Hb and are characterized by microcytic and hypochromic anaemia [2]. The main molecular mechanisms involve large genetic deletions; however, approximately 10% of the  $\alpha$ -thalassemias are caused by point mutations (non-deletional  $\alpha$ -thalassemia) that alter the transcription, translation, or

post-translational processing of the  $\alpha$ -chain of Hb [2,3]. The latter mechanisms result in hyper unstable haemoglobins that cannot be detected by most electrophoretic or chromatographic methods [4,5].

By contrast, structural haemoglobinopathies are primarily due to point mutations. However, small deletions or insertions that result in changes in the amino acid sequence of the protein chain have also been observed. Some of these variants have an altered affinity for oxygen, solubility, stability or electrophoretic mobility [6]. These latter changes can interfere in the analytical determination of clinical parameters such as glycated haemoglobin in diabetic patients, but they do not appear to have a clinical impact [7]. The structural haemoglobinopathies that have an altered affinity for O<sub>2</sub> can be distinguished as those with a high affinity associated with polycythemia or those with a low affinity that cause cyanosis [6].

In this study, we have characterized 4 new variants of the  $\alpha$  globin chain: two are hyperunstable and behave as  $\alpha$ -thalassemias, and two are structural variants that have an altered electrophoretic mobility; one of these is clinically silent, and the other has a decreased affinity for O<sub>2</sub>.

\* Corresponding author at: Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 91 330 3322.  
E-mail address: felixdienteg@hotmail.com (F. de la Fuente-Gonzalo).